



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela Académico Profesional de Ciencias Biológicas

Ploidía en 39 entradas y variación del diámetro de grano de polen en 30 entradas de *Ipomoea trifida* (Kunth) g. Don. (Convolvulaceae) del banco de germoplasma del Centro Internacional de la Papa

TESIS

Para optar el Título Profesional de Biólogo con mención en
Botánica

AUTOR

Víctor Manuel FERNÁNDEZ BRINGAS

ASESOR

Mery Luz SUNI NINATAYPE

Lima, Perú

2011



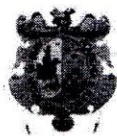
Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Fernández, V. (2011). *Ploidía en 39 entradas y variación del diámetro de grano de polen en 30 entradas de Ipomoea trifida (Kunth) g. Don. (Convolvulaceae) del banco de germoplasma del Centro Internacional de la Papa*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Académico Profesional de Ciencias Biológicas]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGO CON MENCIÓN EN BOTÁNICA
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN DE TESIS)**

Siendo las 17:16 horas del 15 de noviembre de 2011, en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas y en presencia del jurado formado por los profesores que suscriben, se dio inicio a la sesión para optar al Título Profesional de Biólogo con mención en **Botánica** de **VÍCTOR MANUEL FERNÁNDEZ BRINGAS**.

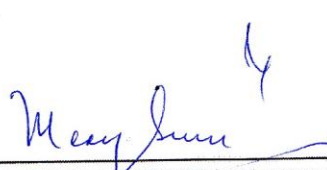
Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° 033-EAPCB-2011, el titulando expuso su tesis: **"PLOIDÍA EN 39 ENTRADAS Y VARIACIÓN DEL DIÁMETRO DE GRANO DE POLEN EN 30 ENTRADAS DE *Ipomoea trifida* (Kunth) G. Don. (CONVOLVULACEAE) DEL BANCO DE GERMOPLASMA DEL CENTRO INTERNACIONAL DE LA PAPA"**, y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota 1.9, calificativo: sobresaliente con mención.

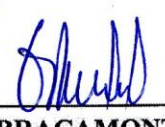
Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Académico Profesional de Ciencias Biológicas y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el Título Profesional de Biólogo con mención en **Botánica** a **VÍCTOR MANUEL FERNÁNDEZ BRINGAS** y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título, conforme a ley.


Siendo las 18:30 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 15 de noviembre de 2011.


Dr. JOSÉ GÓMEZ CARRIÓN
(PRESIDENTE)


Mg. MERY SUNI NINATAYPE
(ASESORA)


Mg. OLGA BRACAMONTE G.
(MIEMBRO)


Mg. MANUEL MARIN BRAVO
(MIEMBRO)

Dedicatoria

A Dios

A mis padres y abuelitas, por su apoyo y porque inculcaron en mi los valores, el amor por la vida y el amor por la familia; a todos los amigos que siempre me apoyaron

Agradecimientos

En primer lugar a Dios, que me ha dado tantas cosas en la vida.

A mi familia, por todo el apoyo que me brindaron durante mi carrera y en la realización de este trabajo.

Al Centro Internacional de la Papa.

Al Dr. David Tay, líder de la División 2: *Caracterización y Conservación de Recursos Genéticos del Centro internacional de la Papa (CIP)*, y a la M.Sc. Genoveva Rossel, porque me brindaron la oportunidad de realizar éste trabajo, además de su asesoramiento y apoyo.

A la fallecida Blga. Matilde Orrillo por su gran apoyo y asesoramiento en todos los aspectos en citogenética y reproducción vegetal durante la realización de la tesis, a su vez mi agradecimiento al M.Sc. Felipe de Mendiburu por el asesoramiento estadístico brindado.

A mi asesora de la UNMSM, la M.Sc. Mery Suni Ninataype por su apoyo, sus consejos y sugerencias a lo largo del trabajo

A mis amigos y colegas: Luís llanos por su gran apoyo y sugerencias durante el desarrollo y culminación de la tesis; Mónica Santallana y Marlon Torres, con quienes aprendimos sobre las técnicas en citogenéticas; Oswaldo Chávez por su apoyo incondicional en estadística.

Al Ing. Roberto Gonzáles y a los técnicos Miguel Javier, Francisco Espinosa José Vélez, y Wilder Rodríguez por su apoyo incondicional.

A todos mis amigos que con su apoyo y amistad contribuyeron de una u otra forma en el desarrollo de esta tesis: Caroline Roullier, Marilyn Enciso, Karin Aponte, Jorge Biondi, Fanny Vargas.

Y por último a todas las personas que estuvieron cerca para darme sus consejos y ayudarme en el tiempo de trabajo.

ÍNDICE GENERAL

I. Introducción.....	1
II. Marco Teórico.....	3
2.1. Taxonomía.....	3
2.1.1. Clasificación taxonómica de <i>Ipomoea trifida</i>	3
2.1.2. Consideraciones taxonómicas.....	3
2.1.3. Descripción botánica de <i>Ipomoea trifida</i>	4
2.2. Número de cromosómico en <i>Ipomoea trifida</i>	5
2.3. Diámetro de grano de polen	7
2.3.1. Frecuencia de polen Gigante	8
2.4. Importancia de <i>Ipomoea trifida</i>	10
2.5. Relaciones filogenéticas.....	12
2.6. Distribución Geográfica de <i>Ipomoea trifida</i>	13
2.7. Aspectos Citogenéticas.....	14
2.7.1. Recuento de cromosomas mitóticos.....	14
2.7.2. Poliploidía.....	16
III. Hipótesis y Objetivos.....	18
IV. Materiales y métodos.....	19
4.1. Materiales.....	19
4.1.1. Material biológico.....	19
4.1.2. Material de laboratorio.....	20
4.2. Métodos.....	22
4.2.1. Preparación del material vegetal.....	22
Germinación de las semillas.....	22
Mantenimiento del material vegetal.....	22

4.2.2. Determinación de los niveles de ploidía.....	23
Conteo de cromosomas en meristemo apical de raíz	23
Preparación de los químicos utilizados.....	25
4.2.3. Determinación de la viabilidad de polen	26
4.2.4. Diámetro de polen.....	26
V. Resultados.....	29
5.1 Niveles de ploidía	29
5.2. Viabilidad de polen.....	34
5.3. Diámetro de polen.....	37
5.3.1. Frecuencia de polen gigante	50
VI. Discusión.....	53
6.1. Niveles de Ploidía	53
6.2. Viabilidad del polen	57
6.3. Diámetro del grano de polen.....	58
6.3.1. Frecuencia de polen gigante	60
VII. Conclusiones.....	65
VIII. Referencias Bibliográficas.....	66
IX. Anexos.....	78

RESUMEN

El nivel de ploidía y su relación con el diámetro de grano de polen fueron analizados en entradas de *Ipomoea trifida*, procedentes de Colombia, Cuba, Guatemala, México, Nicaragua, y Venezuela del Banco de Germoplasma del Centro Internacional de la Papa. En 39 entradas se determinó el nivel de ploidía mediante el conteo de cromosomas en meristemo apical de raíz. En 30 de estas entradas se estudió la relación del diámetro de polen con el nivel de ploidía, usándose controles diploide, tetraploide y hexaploide. Se evaluó también la producción de polen gigante y la viabilidad del polen comparados con los controles diploide y tetraploide. Las 39 entradas evaluadas por conteo de cromosomas fueron diploides con $2n=2x=30$ cromosomas. Mediante un análisis de varianza de factores anidados y prueba de Tukey, con un nivel de significación del 0.05, se determinó que sólo en 16 entradas existía homogeneidad del diámetro de polen en cada individuo de cada una de las entradas. Lo mismo ocurrió con los controles diploides y tetraploides. Al comparar las dieciséis entradas con los controles diploide, tetraploide y hexaploides se encontró que existe correlación ($r=0.92$) del diámetro de polen con el nivel de ploidía. La viabilidad fue cercana al 100% en la mayoría de los individuos. Solamente se en siete entradas se encontró producción de polen gigante entre 0.04% y 2.37% por individuo. El nivel de ploidía presenta correlación con el diámetro de polen pero no puede ser usado como determinante para deducir éste. *Ipomoea trifida* presentó baja producción de polen gigante en las condiciones evaluadas.

Palabras clave: *Ipomoea trifida*, nivel de ploidía, cromosomas, diámetro de polen, polen gigante, viabilidad.

ABSTRACT

The ploidy level and its relation with grain pollen diameter were analyzed in *Ipomoea trifida* accessions from Colombia, Cuba, Guatemala, México, Nicaragua, y Venezuela conserved in trust in the International Potato Center Gene Bank. Ploidy level was determined by chromosome counting in root apical meristem in 39 accessions. Pollen diameter was analyzed in 30 accessions to relate it to the ploidy level, for that diploid, tetraploid and hexaploid controls were used. Giant pollen frequency and pollen viability were also evaluated with diploid and tetraploid controls. All the 39 accessions evaluated were diploids with $2n=2x=30$ chromosomes. Only 16 out of 30 accessions evaluated had homogeneous pollen diameter in each individual plant of each accessions at 0.05 significance level in ANOVA nested factors and Tukey test. The same applied to diploid and tetraploid controls. When the 16 accessions were compared with diploid, tetraploid and hexaploid controls, correlation ($r=0.92$) between ploidy level and pollen diameter was found. Pollen viability was nearly 100% in most individuals in all the accessions studied. Only 7 accessions presented giant pollen of between 0.04% and 2.37% per individual. Ploidy level is correlated to pollen diameter, but it can not be used as a determinant for ploidy level deduction. *Ipomoea trifida* presented low giant pollen production.

Key words: *Ipomoea trifida*, ploidy level, chromosomes, pollen diameter, giant pollen, viability

I. INTRODUCCIÓN

Ipomoea trifida es la especie más relacionada a *Ipomoea batatas*, y se le considera su probable ancestro (Austin, 1987; Jarret y Austin, 1994; Huang y Sun, 2000, Rajapakse *et al.*, 2004; Srisuwan *et al.*, 2006). Además se señala que es poliploide, con tres niveles de ploidía: diploide, tetraploide y hexaploide (Austin, 1987; Nishiyama, 1971; Nishiyama *et al.*, 1975; Teramura, 1979; Ozias-Akins y Jarret, 1994). Ello resulta interesante en los estudios de la filogenia de *I. batatas*, pues ésta se pudo haber originado a través de un proceso de aloploidía (Magoon *et al.*, 1970) o de autoploidía (Nishiyama *et al.*, 1975); en los que estuvo involucrada *I. trifida*. Por otro lado, los niveles de ploidía de ambas especies siempre han dado lugar a discusiones, incluso ambas han sido confundidas entre sí y también con otras especies relacionadas (Ting *et al.*, 1957, Nishiyama, 1959; Jones, 1967; Jones, 1970; Nishiyama, 1971; Martín y Jones, 1972; Nishiyama, 1975; Austin, 1977; Teramura, 1979; Kobayashi, 1984; Austin, 1987; Shiotani y Kawase, 1989; Jones, 1990; Jarret *et al.*, 1992).

Las características morfológicas de los organismos vegetales pueden variar a medida que se incrementa el nivel de ploidía. Kobayashi (1984) mencionó que tallos y hojas pueden incrementar su volumen a mayor nivel de ploidía y que la floración puede verse disminuida a menor nivel de ploidía. La longitud del grano de polen también puede ser influenciada por el nivel de ploidía de la especie, en muchos géneros se ha correlacionado ambas características (Katsiotis y Forsberg, 1995; Altmann *et al.*, 1994; Valladolid, 1996; Jones *et al.*, 2007), pues el diámetro de grano de polen tiende a incrementarse cuando aumenta el nivel de ploidía (Freyre, 1989; Orjeda *et al.*, 1990; Orjeda, 1995).

Otra de las características de *I. trifida* es la producción de polen gigante, el cuál se menciona puede tener el genoma duplicado (Orjeda *et al.*, 1990; Becerra, 1995; Orjeda, 1995; Becerra y Orjeda, 2002). Dicha característica también se presenta

en *I. batatas*. Se piensa por ello que *I. trifida* pudo haber dado origen al camote cultivado a través de hibridizaciones intra e interespecíficas.

Por ello se hace necesario hacer una correcta identificación del nivel de ploidía de *I. trifida* y relacionar dicha característica con un marcador morfológico, como es el diámetro de grano de polen. Además es muy importante conocer si en una entrada se presentan individuos productores de polen gigante, para que estos datos sirvan como base para futuros estudios en la especie.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Taxonomía

2.1.1. Clasificación taxonómica de *Ipomoea trifida* (Cronquist, 1981; 1988 y Austin, 1991)

División: Magnoliophyta

Subdivisión: Angiospermae

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Asteridae

Orden: Solanales

Familia: Convolvulaceae

Género: *Ipomoea*

Serie: Batatas

Especie: *Ipomoea trifida* (Kunth) G. Don.

2.1.2. Consideraciones taxonómicas

Ipomoea trifida pertenece a la familia Convolvulaceae, la cual posee alrededor de 55 géneros y más de 1600 especies, 18 géneros y 151 especies (incluyendo 21 endémicas) se encuentran en el Perú (Ugent y Ochoa, 2006). El género *Ipomoea* L., comprende aproximadamente 600-700 especies (Austin y Huamán, 1996), estando distribuidas en los trópicos, en regiones calientes y templadas del mundo (Ugent y Ochoa, 2006). Más de la mitad de ellas están concentradas en las Américas, donde el total se aproxima a los 500 taxa, en su mayor parte nativas y unas pocas introducidas (Austin y Huamán, 1996).

I. trifida (Kunth) G.Don. se encuentra ubicada dentro del subgénero Eriospermum, sección Eriospermum (formalmente Batatas) y la serie Batatas (Austin y Huamán, 1996). Ésta ha sido revisada y modificada varias veces (Austin, 1978; 1987, Austin *et al.*, 1991) y se encuentra compuesta de 13 especies más un híbrido interespecífico: *I. tabascanana*, la cual, fue últimamente agregada en la serie (McDonald y Austin, 1990).

Ha habido dificultad en la taxonomía de esta Serie (Kobayashi, 1984). La principal razón son las continuas variaciones que ocurren en la morfología debido a factores ambientales, los cuáles pueden afectar la morfología de los sépalos (Kobayashi, 1984). Éstos tienen gran importancia taxonómica para la identificación de las especies en esta serie (Austin, 1978; 1987).

Estudios en cruzabilidad, autocompatibilidad, aspectos morfológicos y citogenéticos dentro del complejo Batatas, lo dividen en dos grupos: A y B (Nishiyama *et al.*, 1975; Oración *et al.*, 1989; Martín y Jones, 1972). En el grupo B se encuentran *I. batatas* e *I. trifida*. En este grupo las especies no autopolinizan, mientras que en el grupo A si lo hacen. Cruces interespecíficos son fácilmente realizados dentro de cada grupo, pero no entre grupos diferentes, así el grupo B no es compatible con el grupo A (Nishiyama *et al.*, 1975).

2.1.3. Descripción botánica de *Ipomoea trifida*

Ipomoea trifida (Kunth) G. Don, Gen. Syst. 4: 280. 1838. *Convolvulus trifidus* Kunth, Nov. Gen. Sp. Pl. 3: 107. 1819.

Enredadera herbácea, voluble, anual; raíz fibrosa; tallo de 1 a 3 m de largo, glabro o piloso, ramificado; pecíolo de 1 a 6 (9.5) cm de largo, glabro o

ligeramente piloso, hojas con lámina ovada, subtrilobada o trilobada, de 2.4 a 9.5 cm de largo, de 2 a 5.7 cm de ancho, ápice obtuso a acuminado, a veces mucronado, base cordada, auriculada, de textura cartácea, glabra o a veces el haz pilósulo; inflorescencias en forma de monocasios y/o dicasios, flores de (1)2 a 9(15), pedúnculo primario de 2.5 a 12(19) cm de largo, glabro o ligeramente piloso, pedúnculos secundarios de 3 a 9 mm de largo, pedicelos de 0.6 a 1.2 cm de largo, glabros o pilosos, por lo general muriculados; sépalos desiguales, elípticos o estrechamente elípticos, de 7 a 10 mm de largo, de 3 a 6 mm. de ancho, agudos, apiculados, escariosos, frecuentemente ciliados, glabros o pilosos, los exteriores cartáceos, más cortos que los interiores, los interiores membranáceos, ciliados; corola infundibuliforme, de 2.2 a 3.8 cm de largo, de 2.5 a 3 cm de ancho, tubo de color lila en el exterior, lila pálido y purpúreo en el interior, limbo de color lila, glabro; estambres desiguales, blancos, inclusos, de 0.7 a 1.3 cm de largo, glandular-pubescentes en la base de los filamentos; estilo de (1)1.2 a 1.7 cm de largo, blanco, glabro, estigma ligeramente bilobado; cápsula subglobosa, de 4 a 6 mm de alto, café clara, bilocular, 4-valvada, glabra o pilosa; semillas 4, subglobosas o triquetras, de 3 a 4 mm de largo y ancho, pardas o negras, glabras y brillantes.

2.2. Número de cromosómico en *Ipomoea trifida*

Las especies del género *Ipomoea* poseen números de cromosomas en múltiplos de 15 (King y Bamford, 1937), por ello todas las especies de la serie Batatas tienen un número básico de cromosomas: $x=15$ (Jones, 1964). La poliploidía y el número de cromosomas: $2n=2x=30$, $2n=4x=60$ y $2n=6x=90$, se asignó a las diferentes especies de este género (Ting *et al.*, 1957; Nishiyama y Teramura, 1962; Nishiyama, 1971; Nishiyama *et al.*, 1975; Shiotani y Kawase, 1987; Orjeda *et al.*, 1990; Yen *et al.*, 1992; Ozias-Akins y Jarret, 1994; Bohac,

1996). Se reporta que *I. trifida* tiene más de un nivel de ploidía, como son: Diploides ($2n=2x=30$), tetraploides ($2n=4x=60$) y hexaploides ($2n=6x=90$). Se dice entonces que *I. trifida* es una especie poliploide (Austin, 1987; Nishiyama, 1971; Nishiyama *et al.*, 1975; Teramura, 1979; Ozias-Akins y Jarret, 1994), pero aún hay discusiones acerca de si en verdad posee los tres niveles (Bohac *et al.*, 1993). Mientras que en *I. batatas* se conocen tanto individuos hexaploides ($2n = 6x = 90$) como tetraploides ($2n = 4x = 60$) (Ozias-Akins y Jarret, 1994; Bohac *et al.*, 1993; Austin, 1987; Becerra, 1995). Otra especie de esta serie, *I. cordato-triloba*, tiene citotipos: $2x$ y $4x$ (Ozias-Akins y Jarret, 1994). Mientras que *I. tabascanana* es tetraploide (Jarret *et al.*, 1992) al igual que *I. tiliacea* (Jones, 1964; 1968). Las demás especies pertenecientes a esta serie son diploides (Jones, 1964).

King y Bamford (1937), por conteo de cromosomas en células de ápice de raíz y observaciones de células madre del polen en meiosis, determinaron que la mayoría de las especies de *Ipomoea* son diploides. Ting *et al.* (1957), observaron también el número de cromosomas en metafase I y/o anafase I, encontrando resultados similares al anterior. Jones (1964; 1968), observó lo mismo en 33 diferentes especies de *Ipomoea*, por el método de aceto-carmín en células en meiosis y en células de meristemo apical de raíz. Además, también reportó que *I. tiliacea* tiene $2n=4x=60$ cromosomas y erróneamente que algunos individuos de dicha especie eran diploides con $2n=2x=30$ cromosomas. Señaló también que existen muchas confusiones taxonómicas, lo que ha ocasionado problemas en diferenciar una especie de otra. Del mismo modo Hrishy y Vijaya (1977), observaron representantes diploides, triploides y tetraploides en *I. obscura*, en observaciones meióticas en polen, por el método de propiono-carmín. Yen *et al.* (1992), también reportaron números cromosómicos de 23 especies de *Ipomoea* encontrando representantes diploides y tetraploides.

Orjeda (1990), evaluó las ploidías en cruces interespecíficos entre *I. batatas* e *I. trifida* por conteo de cromosomas en meristemo apical de raíz por el método de aceto-orceína con buenos resultados. El mismo método fue utilizado por Freyre (1989), para evaluaciones las ploidías en la producción de hexaploides de *I. trifida*; por Oracion (1995), quién determinó el número de cromosomas somáticos en *I. trifida* tetraploides (4x), hexaploides (6x) e híbridos entre *I. batatas* e *I. trifida*; y por Becerra (1995), quien evaluó las ploidías de *I. batatas* e *I. triloba*.

2.3. Diámetro del grano de polen

El tamaño de los granos de polen en un género es influenciado por factores internos (número cromosómico, características de la flor) y externos (temperatura, nutrición mineral, condiciones de agua) (Stanley y linskens, 1974). Se sabe que a mayor nivel de ploidía es mayor el tamaño de grano de polen. Jones *et al.* (2007), encontró que en *Hydrangea macrophylla* los individuos diploides tienen menor diámetro de grano de polen que los triploides. Por otro lado, Katsiotis y Forsberg (1995), pudieron hacer una correlación de las longitudes de los granos de polen en avena con cuatro diferentes niveles de ploidía, que van desde el diploide al octoploide y del mismo modo Altmann *et al.* (1994) encontraron buena correlación en las medidas de tamaño de polen y los niveles de ploidía, en *Arabidopsis thaliana*. Algo análogo encontró Valladolid (1996), determinando que existe diferencia significativa entre el tamaño de los granos de polen de individuos diploides y octoploides en *Oxalis*.

Relaciones similares fueron encontradas en *Ipomoea*. Freyre (1989), observó en *I. trifida*, mediante la técnica de aceto-carmín glicerol, que el tamaño

de grano de polen y el nivel de ploidía se relacionan directamente. Encontró diferencias entre individuos triploides, tetraploides y hexaploides; determinando así, que el diámetro del grano de polen aumenta a medida que aumenta el nivel de ploidía. Otros trabajos fueron realizados con la misma técnica: Orjeda *et al.* (1990), determinaron que el diámetro del polen en *I. trifida* diploide (2x) tiene una distribución normal y bimodal, indicando que en una misma muestra puede haber dos diferentes poblaciones de polen; Iwanaga *et al.* (1991), determinaron que hay diferencias en el diámetro de polen entre individuos triploides, tetraploides y hexaploides, pudiendo ayudarnos estos datos a inferir los niveles de ploidía; Orjeda (1995), evaluó el nivel de ploidía en plantas manipuladas genéticamente de *I. batatas*, encontrando que individuos tetraploides duplicados (los que eran octoploides) presentan un diámetro de polen que es el doble del diámetro de polen de los tetraploides. Se menciona también que los datos morfológicos, como el diámetro de polen, nos podrían dar un indicio del nivel de ploidía; pues en general hojas más grandes, tallos más gruesos y menor cantidad de floración, nos indicarían en *Ipomoea*, un mayor nivel de ploidía; pero éste no puede deducirse sólo por observaciones morfológicas (Kobayashi, 1984)

2.3.1. Frecuencia de polen gigante

Muchas especies de angiospermas presentan granos de polen con un tamaño considerablemente mayor que el tamaño promedio de éste: polen gigante (Veilleux, 1985). Se menciona que dichos granos de polen puede derivar de una mala reducción en la meiosis y se le suele denominar gametos $2n$, debido a que poseen un número cromosómico similar al del esporofito, es decir poseen un valor $2n$ de ploidía (Katsiotis y Wang *et al.*, 2010; Becerra y Orjeda 2002; ; Peloquin *et al.*, 1999; Orjeda, 1995; Forsberg, 1995; Orjeda *et al.*, 1990; Harlan y

De Wet, 1985). Dichos gametos gigantes pueden ser uno de los principales mecanismos para el origen de poliploides en muchas especies (Peloquin *et al.*, 1999; Harlan y De Wet, 1985;). Se hace énfasis en diferenciar el término de polen $2n$ y el de gametos no reducidos, pues éstos últimos se producen solamente por anormalidades en la meiosis; mientras que el polen $2n$ puede ser producido también por anormalidades premeióticas (Wang *et al.*, 2010; Katsiotis y Forsberg, 1995).

La producción de polen gigante ha sido evaluada en muchas angiospermas. Ortiz (1997), trabajó en *Musa* con individuos diploides y poliploides, la identificación de éste tipo de gametos la hizo basándose en el diámetro de polen (el cual es más grande que el diámetro de polen promedio), así identificó a los productores de polen $2n$, y sugirió que ésta podría ser la causa de la existencia de triploides en el género y que la producción de este tipo de polen puede estar influenciada genéticamente. Ramsey (2007), también determinó la producción de polen $2n$ evaluando el tamaño del grano de polen en *Achillea boreales*, determinando que hay una frecuencia muy baja de este tipo de gametos. Bretagnolle (2001), cuantificó la presencia de polen $2n$ y la presencia de semillas poliploides en *Anthoxanthum alpinum*, encontrando que la producción de éste tipo de gametos se da en muy baja cantidad, en las poblaciones evaluadas; además se señaló que la presencia de individuos triploides es una consecuencia de la producción de este tipo de polen. Watanabe y Peloquin (1991) evaluaron especies $2x$, $4x$ y $6x$ en *Solanum*, encontrando diferencias en la frecuencia de plantas productoras de polen $2n$, dicha frecuencia fue variable entre las diferentes las especies (variando entre el 2 y 10% de producción de este tipo de gametos) en el mismo nivel de ploidía. Dewitte *et al.* (2009), encontraron también que en *Begonia* ocurre una producción de polen $2n$, identificaron éste tipo de gametos por observaciones del diámetro de polen y además evaluaron dicha característica por citometría de flujo, para identificar así los el número de granos

con genoma duplicado. Realizaron también observaciones de los procesos meióticos, encontrando que hay formación de mónadas, díadas y tríadas, lo que evidencia aún más la producción de éste tipo de gametos; concluyendo que no es rara la ocurrencia de este tipo de polen en el género. Crespel *et al.* (2006), trabajaron en Rosa, indicando que la producción de polen $2n$ puede variar debido a las condiciones ambientales y observaron que su producción se debía a anomalías producidas en la meiosis.

En el género *Ipomoea* también se ha reportado la producción de polen gigante, lo cual podría haber causado el origen de las series poliploides existentes (Bohac *et al.*, 1992, Orjeda *et al.*, 1990). La evaluación de la producción de dicho tipo de polen en *Ipomoea* se puede realizar en forma directa, midiendo el diámetro del grano de polen (Becerra y Orjeda 2002; Orjeda, 1995; Orjeda *et al.*, 1990), siendo éste un 30% más grande que el promedio del diámetro del grano de polen n (Becerra y Orjeda, 2002; Orjeda, 1995; Orjeda *et al.*, 1990). La producción de polen $2n$ se puede observar durante la meiosis, habiendo buena correlación entre la frecuencia de díadas y tríadas con la frecuencia de polen $2n$. Ésto nos permite detectar aquel tipo de gametos directamente por mediciones en su diámetro (Becerra y Orjeda, 2002; ; Orjeda, 1995; Becerra, 1995; Orjeda, 1990).

2.4. Importancia de *Ipomoea trifida*

Ipomoea trifida es la especie más relacionada filogenéticamente a *I. batatas* siendo su ancestro más probable, lo que la convierte en una especie clave para la interpretación de su origen y evolución (Orjeda, 1990). Además puede producir progenie fértil con ésta (Oracion *et al.*, 1990; Freyre *et al.*, 1991; Orjeda *et al.*, 1991; Oracion, 1995), pudiendo ser usada en programas de

fitomejoramiento, pues posee características genéticas que han llamado la atención de los fitomejoradores como son: la tolerancia a sequía, la resistencia a enfermedades y la calidad de raíz (Shiotani et al., 1994); pues fue reportada la tuberización en *I. trifida* (2x) por Austin (1978) y por Hambali (1988).

Las especies de *I. trifida* son malezas en hábitats abiertos mayormente disturbados por humanos y a veces son malezas de algunos cultivos (Shiotani et al., 1994). Es una especie polinizada por insectos, es perenne y se propaga predominantemente por semillas. Es una especie autoincompatible (Nishiyama et al., 1975; Oracion et al., 1989; Martín y Jones, 1972). Ocurre en ésta un completo fracaso de la germinación del polen en la superficie de su propio estigma, no produciendo semillas (Kowyama et al., 1980). Esto promueve la polinización cruzada y mantiene la diversidad genética en las poblaciones. Es por ello que *I. trifida* es preferida para hacer estudios genéticos en relación a la autoincompatibilidad, por ser una especie diploide (Kowyama et al., 2000). La autoincompatibilidad en esta especie es un carácter determinado por un simple locus multialélico "S" (Rahman et al., 2007), el cual causa completo fracaso en la germinación del polen sobre la superficie de estigma después de la autopolinización.

Por otro lado, Kobayashi (1984) propuso el término: Complejo *I. trifida*, para un grupo ecológico de plantas con diferentes niveles de ploidía, que van del diploide al hexaploide y diferentes ecotipos presumiblemente adaptados a ambientes especiales. Las plantas pertenecientes a este complejo e *I. batatas* tienen un genoma común (Shiotani y Kawase, 1980; citados por Kobayashi, 1984).

2.5. Relaciones filogenéticas

Hay mucha confusión en la literatura concerniente a la identidad de las especies relacionadas con *I. batatas*. Dichas especies muchas veces no están bien definidas morfológicamente, produciéndose muchos errores en la identificación (kobayashi, 1984). Austin (1987), concluyó por caracteres morfológicos, especialmente sépalos y pubescencia, que *I. triloba* era uno de los candidatos que posiblemente donó el genoma para dar origen a *I. batatas* y que *I. trifida* es uno de los más probables ancestros del camote. Shiotani y Kawase (1989), indicaron también que *I. trifida* es la especie más relacionada a *I. batatas*. Por otro lado McDonald y Austin (1990) reportaron una nueva especie: *I. tabascana*, la cual es endémica de México y basándose en la morfología de los sépalos indicaron que ésta es similar a *I. trifida*. Quedando indicado que ésta nueva especie era un aliado cercano de *I. batatas*. (Austin y De la Puente, 1991)

Con el uso de marcadores RFLP e incluyendo a *I. tabascana*, Jarret *et al.* (1992) encontraron que *I. batatas* tetraploide, *I. trifida* e *I. tabascana* son las especies más relacionadas al hexaploide *I. batatas*. La misma relación fue obtenida con marcadores RAPDs (Jarret y Austin, 1994). Huang y Sun (2000), mediante ISSR y análisis de restricción de DNA de cloroplasto, encontraron también que *I. trifida* es la especie más relacionada a *I. batatas*; además un grupo de tres de estas, provenientes Guatemala, México y Nicaragua, presentaron una mayor similaridad a *I. batatas* que el resto de *I. trifida*. Ellos encontraron también que *I. triloba* es una de las especies más alejadas a *I. batatas* en la serie, con ello que se refutó parte del postulado de Austin (1987), que se basó solamente en caracteres morfológicos. Similares resultados fueron obtenidos por Hu *et al.* (2003) mediante marcadores ISSR y Huang *et al.* (2002) con marcadores de polimorfismo AFLP. Rajapakse *et al.* (2004) haciendo un análisis de secuencias de β -amilasa, mencionan la relación de *I. tabascana* con *I.*

batatas e *I. trifida*., indicando que ésta podría haber derivado de una hibridización entre el hexaploide *I. batatas* y el diploide *I. trifida*, pues su forma diploide jamás ha sido reportada. Srisuwan *et al.* (2006), estudiando la organización de cromosomas, reportaron que el tetraploide *I. trifida* fue considerado más relacionado con *I. batatas* que el diploide *I. trifida* y que *I. tabascanana*. Ellos mencionan que dichos resultados fueron apoyados por la cruzabilidad entre ambos niveles de ploidía de *I. trifida* (2x, 4x y 6x) con el hexaploide *I. batatas*. La cruzabilidad entre *I. batatas* (6x) e *I. trifida* (6x) les dio mayor producción de semillas que con los demás niveles de ploidía de *I. trifida* (Xie *et al.*, 2002; citados por Srisuwan *et al.*, 2006).

2.6. Distribución Geográfica de *Ipomoea trifida*

La mayor diversidad de germoplasma de camote se encuentra desde el Noreste de Sudamérica y partes de Centro América, éstas también son las regiones geográficas donde *I. trifida* es abundante (Austin, 1987). Podemos decir entonces que la distribución de *I. trifida* se encuentra en el área que corresponde al Caribe. Shiotani *et al.* (1994), mencionó que la distribución de *I. trifida* 2x va desde los estados del noreste al sureste de México, Guatemala, Panamá y Colombia y probablemente Venezuela. Mencionó también que *I. trifida* 4x es común entre el centro y sur de México, el sur de los valles de Guatemala, y más allá en Colombia, Ecuador y probablemente extendida en el norte del Perú; en altitudes desde el nivel del mar hasta los 1600m. Además mencionó que *I. trifida* 6x es endémica en los valles del este de la Meseta Central en México, hay muy pocas colectas de estos individuos (Iwanaga *et al.*, 1989). Kobayashi (1984), también menciona que *I. trifida* se encuentra profusamente en lugares con elevaciones de entre 5 a 20m. sobre el nivel de mar, observándose muchas

comunidades de ésta en Santa Marta, Colombia. Similares plantas fueron observadas también en Maracay, Venezuela, siendo todas diploides ($2n=2x=30$).

Kobayashi (1984) menciona que hay plantas intermedias entre *I. batatas* e *I. trifida* en Cali–Buenaventura (1500 - 2000msnm), Colombia, San José – Turrialba (600 – 1800), Costa Rica, y alrededor de Veracruz (5 – 10), México. Muchos tetraploides que fueron identificados como *I. trifida* fueron observados cerca de Cali, Colombia y a lo largo de la costa del Mar Caribe cerca de Veracruz, México. Él sugiere que los individuos diploides de *I. trifida* pueden dar origen a individuos tetraploides por autoploidía, los cuales serían ecotipos de ésta y se encuentran distribuidos desde los andes hasta México.

2.7. Aspectos Citogenéticos:

2.7.1. Recuento de cromosomas mitóticos

Para poder observar los cromosomas mitóticos en una especie se debe seguir una serie de procedimientos:

Prefijación: La pre-fijación con inhibidores de la mitosis es una etapa importante para la obtención de óptimos resultados cariológicos. El pretratamiento es importante porque: (a) limpia el citoplasma, (b) permite la separación de la lámina media, causando un ablandamiento del tejido vegetal o (c) permite el esparcimiento de los cromosomas con la clarificación de las regiones de constricción. El pre-tratamiento también podría ser necesario para lograr una rápida penetración del fijador por la remoción de restos de tejido indeseables. De los tres aspectos antes mencionados el tercero es el más importante, pues tiene un efecto directo en los cromosomas (Sharma y Sharma, 1980). Uno de los más

importantes grupos de componentes investigados en su acción para el estudio de los cromosomas, es el complejo quinolina. La 8-hidroxiquinolina causa el detenimiento de la mitosis, inactivando el huso, lo cual permite a los cromosomas ser extendidos por toda la célula durante el squash. La Hidroxiquinolina permite a los cromosomas mantener su relativo ordenamiento en el plano ecuatorial. Los cromosomas se mantienen ordenados lo que sugiere que éstos aún se encuentran ligados al huso (el cambio en la viscosidad del citoplasma no permite el movimiento de los cromosomas). Una de Las limitaciones de su uso en plantas es que requiere de un largo periodo de tratamiento (Sharma y Sharma, 1980).

Fijación: Las raíces son luego fijadas con el fin de interrumpir los procesos vitales de la muestra, conservando invariable la estructura de las células (Valladolid *et al.*, 2004). Para preservar una sección del tejido se requiere un fluido que no distorsione ni disuelva la estructura celular, elimine bacterias y hongos, mantenga inactivas a las enzimas autocatalíticas, además de modificar el tejido en forma tal que llegue a ser capaz de "resistir" los tratamientos subsecuentes (Valladolid *et al.*, 2004). Uno de los fijadores más usados es la mezcla de alcohol absoluto y ácido acético glacial. El etanol fija el citoplasma y el jugo nuclear, mientras que el ácido acético estabiliza las nucleoproteínas (Valladolid *et al.*, 2004).

Maceración: Es importante que las células se encuentren dispersas formando una sola capa, evitando así la superposición y puedan ser observadas en el microscopio. Para lograr este objetivo se deben destruir tanto la pared celular y la pectina de las uniones intercelulares. Para tal efecto se pueden utilizar agentes químicos o tratamientos enzimáticos (celulasas y pectinasas). Entre los primeros, el más importante es el ácido clorhídrico 1 normal, que provoca la disolución de las sales pécticas de la lámina media facilitando la separación de las células y el aclaramiento del citoplasma (Valladolid *et al.*, 2004).

Tinción: La estructura y comportamiento de los cromosomas sólo pueden ser analizados después que son visibles bajo el microscopio óptico. Para teñir los cromosomas se utilizan tintes básicos debido a la naturaleza ácida de la cromatina. Las sustancias que son utilizadas como tintes se disuelven en agua en forma de iones coloreados. Estos iones se enlazan química y físicamente a las proteínas, sin perder su color (Sharma y Sharma, 1991). En el estudio de los cromosomas se usa la orceína en forma de aceto-orceína, la cual es una mezcla de esta con ácido acético glacial.

Aplastado o squash: Una presión aplicada en el preparado permite que los cromosomas se separen y dispersen por toda la célula (Sharma y Sharma, 1980). Pudiendo así ser bien visualizados los cromosomas en el microscopio (Valladolid *et al.*, 2004).

2.7.2. Poliploidía

El número básico de cromosomas en una célula, característico de la especie, se designa con la letra n y representa cuantos cromosomas diferentes hay en el cariotipo (conjunto de cromosomas convenientemente ordenado que define a cada especie). Se denomina dotación euploide a la que es múltiplo de n (nX). Las dotaciones euploides mas frecuentes son: haploide (n cromosomas), diploide ($2n$), triploide ($3n$) y tetraploide ($4n$). La dotación normal de una célula somática es la diploide y la de los gametos la haploide. Las dotaciones euploides con $3n$ o más cromosomas se denominan poliploides, y se producen por fallas en el reparto anafásico (Paniagua, 2007).

El término poliploidía describe los casos en donde se encuentran múltiplos de más de dos dotaciones haploides de cromosomas (Klug *et al.*,

2006). La denominación de los poliploides se basa en el número de dotaciones que se encuentra: Un triploide tiene $3n$ cromosomas, un tetraploide $4n$, un pentaploide $5n$ y así sucesivamente (Klug *et al.*, 2006).

La poliploidía es mucho más común en vegetales. Números impares no se mantienen normalmente de manera segura de generación en generación. Ya que un organismo poliploide con un número impar de homólogos no produce normalmente gametos genéticamente equilibrados. Por ello los triploides, pentaploides y similares no se encuentran normalmente en especies que dependan exclusivamente de la reproducción sexual para su propagación (Paniagua, 2007).

La poliploidía se puede originar de dos modos: (1) la adición de una o más dotaciones extra de cromosomas, idénticas a la dotación haploide normal de la misma especie, que da lugar a la *autopoliploidía* y (2) como consecuencia de cruces interespecíficos puede darse la combinación de dotaciones cromosómicas de especies diferentes dando lugar a la *alopoliploidía*. La distribución entre ambas se basa en el origen genético de las dotaciones cromosómicas extra (Klug *et al.*, 2006).

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. Hipótesis

- Existen diferencias en el nivel de ploidía entre las accesiones de la especie *Ipomoea trifida*, del Banco de Germoplasma del Centro Internacional de la Papa, guardando relación con el diámetro de grano de polen.

3.2. Objetivos

Objetivo general

- Determinar los niveles de ploidía en 39 entradas de la colección de *Ipomoea trifida* (Kunth) G. Don. del Banco de Germoplasma del Centro Internacional de la Papa y si existe relación con el diámetro de los granos de polen.

Objetivos específicos

- Verificar el número cromosómico de las 39 diferentes entradas.
- Clasificar la colección de *Ipomoea trifida* de acuerdo a los niveles de ploidía.
- Determinar si es que el tamaño de polen es un buen indicador para inferir los niveles de ploidía.
- Determinar el número de individuos productores de polen gigante en cada entrada.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Materiales

4.1.1. Material biológico

Se trabajó con plantas obtenidas de semillas de *Ipomoea trifida* del Banco de Germoplasma del Centro Internacional de la Papa, ubicado en el distrito de La Molina, Lima. Se usaron 39 entradas provenientes de: México, Colombia, Cuba, Guatemala, Nicaragua, y Venezuela, en el anexo 9.1 se muestran todas las entradas evaluadas con sus coordenadas geográficas de procedencia y en el anexo 9.2. se muestra el mapa de distribución geográfica.

Se seleccionaron las semillas originales, provenientes de colectas, y aquellas a las que no se hizo polinización cruzada alguna en su regeneración, en cada entrada. Se usaron también otras entradas como controles, para la evaluación en polen, las entradas: CIP 430406 (*I. trifida* diploide), CIP 430434 (*Ipomoea spp.* tetraploide), CIP 430452, (*I. batatas* hexaploide), cuyos niveles de ploidía fueron verificados por conteo cromosómico; además de las entradas CIP 420023 y CIP 421123 (*I. batatas*, de las que ya se conocía el nivel de ploidía).

4.1.2. Material de laboratorio

Reactivos:

- Ácido sulfúrico QP.
- Ácido clorhídrico 1N.
- Ácido acético glacial QP.
- Agua destilada.
- 8-hidroxiquinolina (0.002M).
- Etanol 100%.
- Orceína 4gr (usada en forma de aceto-orceína 0.02 gr/ml)
- Carmín
- Glicerol.

Accesorios

- Plumón marcador
- Pinzas
- Estiletes
- Goteros
- Pizetas
- Papel platino
- Frascos de vidrio
- Viales
- Pipetas pasteur
- Probetas
- Vasos precipitados
- Láminas porta objeto
- Láminas cubre objetos
- Papel Whatman.

- Hojas de bisturí
- Placas petri
- Cocinilla eléctrica

Equipos

- Microscopio óptico Olympus Cx31
- Cámara fotográfica Olympus C5060
- Cámara fotográfica Nikon C5000
- Campana extractora
- Cámara germinadora

Material de invernaderos

- Tinglados
- Bandejas plásticas
- Macetas plásticas de 6 pulgadas
- PRO-MIX ® 'BX' (Sustrato)
- Tutores
- Etiquetas de barra
- Jiffy-7 (Pastilla de turba prensada para siembra de esquejes)
- Fertilizante PETERS professional ® - Soluble Plant Food (20-20-20)
- Fertilizante foliar Byfolan® S

Software

- SAS/STAT software, Version 9.2.
- R versión 2.13.0

4.2. Métodos

4.2.1. Preparación del material vegetal:

Se trabajó en tinglados y laboratorios de la División 2, Recursos Genéticos Conservación y Caracterización, del Centro Internacional de la Papa ubicado en el distrito de La Molina, Lima. Se siguieron los siguientes procedimientos:

Germinación de las semillas

Se pusieron a germinar quince semillas de cada entrada para obtener por lo menos 10 plantas. Antes de ello, se trató las semillas para su germinación. Dicho tratamiento consistió en realizar una escarificación con ácido sulfúrico concentrado (98%), durante 20 minutos. Pasado este tiempo las semillas fueron enjuagadas en abundante agua y permanecieron en ésta durante toda la noche. Finalmente fueron puestas en placas petri para su germinación (Huamán, 1999; Becerra, 1995; Orjeda, 1990). Las placas petri, conteniendo las semillas, fueron luego colocadas en la cámara germinadora con una temperatura entre 18 y 20°C, con un fotoperiodo de 12 horas luz.

Mantenimiento del material vegetal

En aproximadamente 5 días emergieron las plántulas, éstas fueron llevadas a un tinglado y sembradas en jiffy-7 para que desarrollen. Obtenidas las plantas, éstas fueron transferidas a macetas plásticas de 6 pulgadas de diámetro, en el substrato Promix y puestas en una mesa, para evitar el enraizamiento fuera de las macetas. La fertilización se hizo con los abonos: PETERS y Byfolan. Luego de tres semanas se colocó tutores a las plantas, los que brindaron soporte y dirección a las ramas en crecimiento (Becerra, 1995;

Orjeda, 1990). Se realizaron los cuidados rutinarios como: riego, poda, abonado y control de plagas. Algunas de las plantas se muestran en el anexo 9.3.

4.2.2. Determinación de los niveles de ploidía

Conteo de cromosomas en meristemo apical de raíz

Se tomaron esquejes de 10 centímetros de longitud y fueron puestos en viales de color ámbar con agua potable, durante aproximadamente dos semanas hasta que produjeron raíces. Para poder observar los cromosomas mitóticos se realizó el teñido de los meristemos apicales de raíz en aceto-orceína, Los pasos seguidos para ello se describen a continuación:

Pretratamiento y fijación de la muestra: (ver anexo 9.4)

- Se colectaron las raíces entre 6 y 8 de la mañana. Las raíces extraídas se colocaron en una solución de 8-hidroxiquinolina 0.002M durante 4 horas en una incubadora a 15°C, para su prefijación.
- Luego se eliminó la hidroxiquinolina de la muestra y se añadió fijador farmer (3 partes de etanol absoluto: 1 parte de ácido acético glacial), para su fijación.
- Se dejó la muestra en el fijador durante 24 horas a temperatura ambiente. Si se deseaba guardar la muestra por más tiempo, para su evaluación posterior, se hacía el cambio del fijador por alcohol al 70% y se mantenía en refrigeración a 4°C.

Hidrólisis: (ver anexo 9.5)

- Se calentó el ácido clorhídrico 1N en un horno a 60°C.
- Las muestras fueron sumergidas en el ácido caliente y puestas en el horno durante 20 min.

- Pasado dicho tiempo se sacaron las raíces del horno y se eliminó el ácido enjuagando tres veces con agua destilada.

Tinción: (ver anexo 9.5):

- Luego de eliminada el agua se añadió 2 cm³ de aceto-orceína (0.02gr/ml), dejando las raíces en ésta por lo menos durante 24 horas, para tener una buena coloración.

Esta técnica ha sido usada para determinar los niveles de ploidía en plantas del género *Ipomoea* con buenos resultados (Ogunwenmo, 2005; Becerra y Orjeda, 2002; Orjeda, 1995; Orjeda, 1990; Orjeda *et al.*, 1990; Freyre, 1989; Nakajima, 1963).

Preparación de las muestras para observar: (ver anexo 9.6)

- Se sacaron las raíces y se cortó el ápice sobre una lámina porta objeto.
- Luego se añadió una gota de aceto-orceína, y se colocó un cubre-objeto, procediéndose a golpear éste con un lápiz, para disgregar las células del meristemo.
- Luego se aplastó firmemente con el dedo cubriendo la muestra con papel whatman (squash). Cuidando no deslizar el cubreobjeto.
- Se procedió a la observación en el microscopio compuesto.

Para determinar el número cromosómico se contó el número de cromosomas de tres células en cada raíz, tomándose tres raíces por individuo y se evaluó entre uno y cinco individuos por cada entrada (tres en su mayoría)

Preparación de los químicos utilizados:

Hidroxiquinolina 0.002M (para un litro de solución)

Se debe pesar 0.29g de 8-hidroxiquinolina y disolverlos en 10ml de etanol al 96%. Luego colocar la solución en un frasco oscuro y cubrirlo con papel aluminio, para evitar la entrada de luz. Finalmente agregar agua destilada lentamente hasta completar un litro y mantener refrigerado.

Ácido clorhídrico 1N. (para un litro de solución)

Medir 83.33ml de HCl al 37% (concentrado) y completar a un litro con agua destilada.

Fijador Farmer:

Mezclar 3 partes de etanol al 100% con 1 parte de ácido acético glacial.

Aceto-orceína:

Colocar 110ml de ácido acético glacial en un vaso precipitado y calentarlo (se debe trabajar en campana extractora), cuando empiece a hervir añadir 4g de orceína y dejar que continúe la ebullición a fuego lento y en constante agitación durante 10 minutos. Luego dejar enfriar y completar hasta 90ml con ácido acético (si fuera necesario), luego llevar hasta 200ml con agua destilada. Finalmente filtrar todo una o dos veces.

4.2.3. Determinación de la viabilidad de polen

La evaluación se hizo en la estación experimental de La Molina. Se evaluaron 30 entradas con los controles diploide y tetraploide. La colecta de las flores se hizo entre las 7.30 y las 9.30 a.m y fueron mantenidas en cámara húmeda. Se realizó una tinción con aceto-carmín glicerol según lo descrito por Marks (1954). La tinción consistió en poner una gota de aceto-carmín glicerol en una lámina porta objeto y hacer caer, por agitación y aplastado de anteras, el polen en ella; tratando de dispersar bien los granos de polen (anexo 9.7). Luego las láminas fueron cubiertas con una laminilla cubre objetos y se almacenaron a temperatura ambiente por al menos 24 horas, para que la tinción sea buena (Orjeda, 1995; Iwanaga *et al.*, 1991; Orjeda *et al.*, 1990; Freyre, 1989). Pasado éste tiempo se procedió a observar las muestras en el microscopio óptico Olympus Cx31 a 100 aumentos (con el objetivo de 10x). La evaluación de la viabilidad de de polen fue estimada analizando la tinción. Dicha evaluación se hizo contando al menos 200 granos de polen por individuo, identificándose el número de granos teñidos (polen viable) y no teñidos (polen no viable).

4.2.4. Diámetro de polen

Para evaluar el diámetro de polen se utilizó el mismo material de la evaluación de la viabilidad y además se incluyó las 3 entradas control hexaploides, de las cuales se tomó polen de un individuo por cada una de ellas. Ello debido a que solamente un individuo de nuestro control hexaploide inicial produjo flores.

El diámetro de los granos de polen fue medido en un microscopio óptico a 400 aumentos (con el objetivo de 40x), ayudándonos con un ocular micrométrico. Las unidades de medida fueron en $\text{mm} \times 10^{-2}$. Se procedió a medir el diámetro de 13 granos de polen en cada individuo, con lo que se identificó las diferencias entre cada entrada.

Se evaluó también la frecuencia de polen gigante, la cuál fue directamente determinada por medición del diámetro de éstos, identificando como gigantes aquellos que eran 30% más grandes que el diámetro promedio de polen normal (Becerra y Orjeda, 2002; Becerra, 1995; Orjeda, 1995; Orjeda, 1990). Cabe mencionar que en la evaluación del diámetro de los 13 granos de polen, para hacer las comparaciones entre los niveles de ploidía, no se incluyó los granos de polen gigantes, sólo se tomaron los valores menores a éstos.

El análisis se realizó mediante un análisis de varianza de factores anidados y la prueba de Tukey con una significancia del 0.05. Para determinar si es que existen diferencias significativas entre los valores de diámetro de polen entre los individuos de cada entrada y entre las entradas y entre los diferentes niveles de ploidía.

Para la evaluación de la frecuencia de polen gigante se contó el número total de granos de polen viable en cada individuo y el número de granos de polen gigante , se calculó la frecuencia de polen gigante de la siguiente manera:

$$\textbf{Frecuencia de polen gigante} = N^{\circ} \text{de granos de polen gigante} / N^{\circ} \text{total de granos de polen}$$

Para un mejor manejo de datos se trabajó con el valor de la frecuencia en términos de porcentaje, de la siguiente manera:

$$\textbf{Porcentaje de polen gigante} = \text{Frecuencia de polen gigante} \times 100\%$$

Por otro lado para evidenciar la producción de polen gigante se hizo la observación de células madres de las microsporas. Para ello se colectó yemas florales inmaduras de 3 mm de longitud en fijador Farmer entre las 7 y 9 am. Las muestras permanecieron en fijación durante 24 horas y luego se procedió a

disectarlas para obtener los estambres inmaduros. Una vez obtenidos éstos fueron aplastados en una lámina porta objetos a la cual se le colocó previamente una o dos gotas de aceto-carmín glicerol y luego cubiertos con una lámina cubre objetos. Se dejó durante 24 horas para que se de una buena coloración, luego de la cuál se procedió a su observación en el microscopio para la identificación de las díadas y triadas.

V. RESULTADOS

5.1 Niveles de ploidía

La tinción de los meristemos apicales de raíz con aceto-orceína dio buenos resultados, permitiéndonos observar claramente los cromosomas (figura 1). La observación se hizo en metafase, donde los cromosomas se encuentran en su máxima condensación. Las 39 entradas evaluadas resultaron ser diploides con $2n=2x=30$ cromosomas (tabla 1). También se confirmó, por conteo de cromosomas, el nivel de ploidía de los controles: CIP 430406, CIP 430434 y CIP 430452 (figura 2).

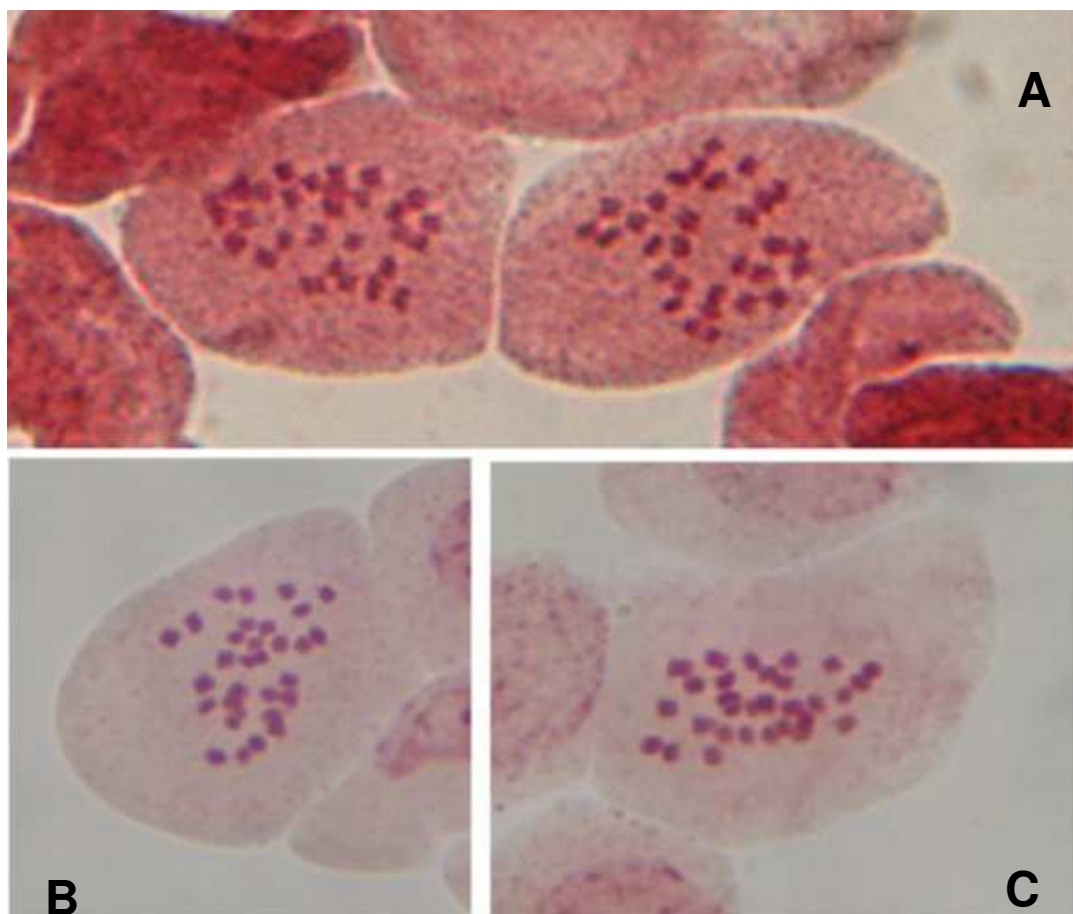


Figura 1. Células meristemáticas de raíz de tres de las entradas evaluadas observadas a 1000 aumentos. Nótese que todas son diploides $2n=2x=30$: **(A)**. CIP 460551 proveniente de Cuba. **(B)**. CIP 460435 proveniente de Nicaragua. **(C)**. PI 634790 proveniente de México.

Tabla 1. Número de cromosomas de las 39 entradas en meristemo apical de raíz. Se evaluaron entre 1 a 5 individuos por entrada. En cada individuo se tomó 3 raíces y en cada una de ellas se hizo la evaluación de tres células.

Entrada	Individuo	1 raíz	2 raíz	3 raíz	Moda	Ploidía
CIP 460097	1	30 30 30	30 30 29	30 30 30	30	2x
	2	30 30 29	30 30 30	30 30 -	30	
	3	30 30 30	30 30 30	30 30 29	30	
CIP 460099	1	30 30 30	30 30 30	30 30 30	30	2x
	2	30 30 30	30 30 30	30 30 -	30	
	3	29 30 30	30 30 30	30 30 30	30	
CIP 460109	1	29 30 30	30 29 30	30 30 29	30	2x
	2	30 30 30	30 30 30	30 30 30	30	
	3	30 30 30	30 30 29	30 30 30	30	
CIP 460110	1	30 30 30	30 30 30	30 30 29	30	2x
	2	30 30 30	30 30 30	29 30 30	30	
	3	30 30 30	30 30 30	30 29 30	30	
CIP 460111	1	30 30 30	30 30 30	30 30 30	30	2x
CIP 460187	1	30 30 30	30 30 30	30 30 30	30	2x
	2	30 30 29	30 30 30	30 30 -	30	
	3	30 29 30	30 30 30	30 29 30	30	
CIP 460226	1	30 30 30	30 30 30	30 30 -	30	2x
	2	30 30 29	30 30 30	30 30 30	30	
	3	30 29 29	30 30 30	30 30 30	30	
CIP 460262	1	30 30 30	29 30 30	30 30 30	30	2x
	2	29 30 30	30 30 30	30 30 30	30	
	3	30 30 30	30 30 30	29 30 30	30	
CIP 460371	1	30 29 30	30 30 30	29 30 30	30	
CIP 460379	1	30 29 30	30 30 30	29 30 30	30	2x
	2	30 30 30	30 30 30	30 30 30	30	
	3	30 29 29	30 30 30	30 30 -	30	
CIP 460380	1	30 30 30	29 30 30	30 30 30	30	2x
	2	30 30 30	30 30 30	30 30 30	30	
	3	30 30 30	29 30 30	30 29 30	30	
CIP 460385	1	30 30 30	30 30 29	30 30 -	30	2x
	2	30 30 30	30 30 30	30 30 29	30	
	3	30 30 29	30 30 30	30 30 30	30	
	4	30 29 30	30 30 30	30 30 29	30	
CIP 460386	1	30 30 30	30 30 30	30 30 29	30	2x
	2	30 30 30	30 30 30	29 29 30	30	
	3	30 30 30	30 29 30	30 30 30	30	
CIP 460387	1	30 30 30	30 30 30	30 29 30	30	2x
	2	30 30 30	30 30 -	30 30 30	30	
	3	30 30 30	30 29 30	30 30 -	30	

Tabla 1. Continuación.

Entrada	Individuo	1 raíz	2 raíz	3 raíz	Moda	Ploidía
CIP 460388	1	30 30 30	30 30 30	30 30 29	30	2x
	2	30 29 30	30 30 30	30 30 -	30	
	3	30 30 30	30 30 30	30 30 30	30	
CIP 460390	1	30 29 30	29 30 -	29 30 -	30	2x
	2	30 30 30	30 30 30	30 30 30	30	
	3	30 30 30	30 30 29	29 30 -	30	
	4	30 30 30	30 30 30	30 30 -	30	
	5	30 30 30	29 30 30	30 30 29	30	
CIP 460403	1	30 30 30	30 29 30	30 30 30	30	2x
	2	30 30 29	30 30 30	30 30 30	30	
	3	30 30 30	30 30 30	30 30 -	30	
CIP 460406	1	30 30 30	30 30 30	30 - 30	30	2x
	2	30 31 30	30 30 30	30 30 29	30	
	3	30 30 29	30 30 -	29 30 -	30	
	4	30 30 30	30 30 30	30 30 30	30	
CIP 460407	1	29 30 30	30 30 30	30 29 29	30	2x
	2	30 30 30	29 30 30	30 30 29	30	
	3	30 30 30	30 29 29	30 30 -	30	
CIP 460408	1	30 29 30	30 29 30	30 30 30	30	2x
	2	30 30 30	30 30 30	30 29 30	30	
	3	30 30 29	30 30 29	29 30 30	30	
CIP 460410	1	29 30 29	30 30 30	30 30 30	30	2x
	2	30 30 30	30 30 29	29 30 30	30	
	3	30 30 30	29 30 30	30 30 30	30	
CIP 460411	1	30 30 30	30 30 30	30 29 30	30	2x
	2	30 29 30	30 29 29	30 30 30	30	
	3	30 30 30	29 29 30	29 30 30	30	
CIP 460412	1	29 30 30	30 30 29	30 30 30	30	2x
	2	30 30 29	30 29 30	29 29 30	30	
	3	30 30 29	30 30 30	29 30 30	30	
CIP 460424	1	30 30 29	30 30 30	29 30 30	30	2x
	2	30 30 30	30 30 30	30 30 30	30	
	3	30 30 30	29 29 30	30 30 -	30	
CIP 460429	1	30 30 30	29 30 30	30 30 30	30	2x
	2	30 30 30	30 29 30	30 29 30	30	
	3	30 30 29	30 29 30	30 30 30	30	
CIP 460431	1	30 30 30	30 30 30	30 30 30	30	2x
	2	29 30 30	30 30 30	30 30 -	30	
	3	30 30 29	30 30 30	29 30 30	30	
CIP 460432	1	30 30 30	30 30 30	30 30 30	30	2x
	2	30 30 30	29 30 30	30 30 -	30	
	3	30 30 30	30 30 30	30 30 30	30	

Tabla 1. Continuación

Entrada	Individuo	1 raíz	2 raíz	3 raíz	Moda	Ploidía
CIP 460435	1	30 30 30	30 30 29	30 30 30	30	2x
	2	30 30 30	30 30 30	30 29 30	30	
	3	30 30 -	30 30 30	30 30 30	30	
	4	30 30 30	30 30 30	30 30 -	30	
	5	30 30 30	30 30 30	30 30 30	30	
CIP 460438	1	30 29 30	30 30 30	30 30 -	30	2x
	2	30 30 30	29 30 30	30 30 30	30	
	3	30 30 30	30 30 30	30 30 30	30	
CIP 460551	1	30 30 30	30 30 30	30 30 30	30	2x
	2	30 30 30	30 30 -	30 30 -	30	
	3	30 30 30	30 30 30	30 30 30	30	
CIP 460736	1	29 30 30	30 29 30	30 30 30	30	2x
	2	30 30 29	30 30 30	30 30 29	30	
	3	30 30 29	30 30 30	29 30 30	30	
CIP 460741	1	30 29 30	30 30 30	30 30 30	30	2x
	2	30 30 30	30 30 29	30 30 -	30	
	3	29 30 30	30 30 30	30 30 30	30	
CIP 460745	1	30 30 30	30 29 30	30 30 30	30	2x
	2	30 30 30	30 30 30	30 30 30	30	
CIP 460763	1	30 29 30	30 29 30	30 30 30	30	2x
	2	30 30 30	30 30 30	30 30 30	30	
	3	30 30 29	29 30 30	30 30 30	30	
CIP 460229	1	29 30 30	30 30 30	30 30 30	30	2x
	2	30 30 30	29 30 30	30 30 30	30	
	3	29 29 30	29 30 29	30 30 29	30	
CIP 460231	1	30 30 30	30 30 30	30 30 30	30	2x
	2	30 30 29	30 30 29	29 30 30	30	
	3	30 30 30	30 30 30	29 30 30	30	
CIP 460232	1	29 30 -	30 30 29	30 30 30	30	2x
	2	30 29 30	30 30 30	30 30 30	30	
	3	30 30 30	29 30 29	30 30 30	30	
PI 634790	1	30 30 30	30 29 30	30 30 30	30	2x
	2	29 30 30	29 30 30	30 30 30	30	
	3	30 30 30	29 30 30	30 29 30	30	
PI 634792	1	30 30 30	30 30 29	30 30 30	30	2x
	2	30 30 30	29 30 30	30 30 30	30	
	3	30 30 30	30 29 30	29 30 30	30	

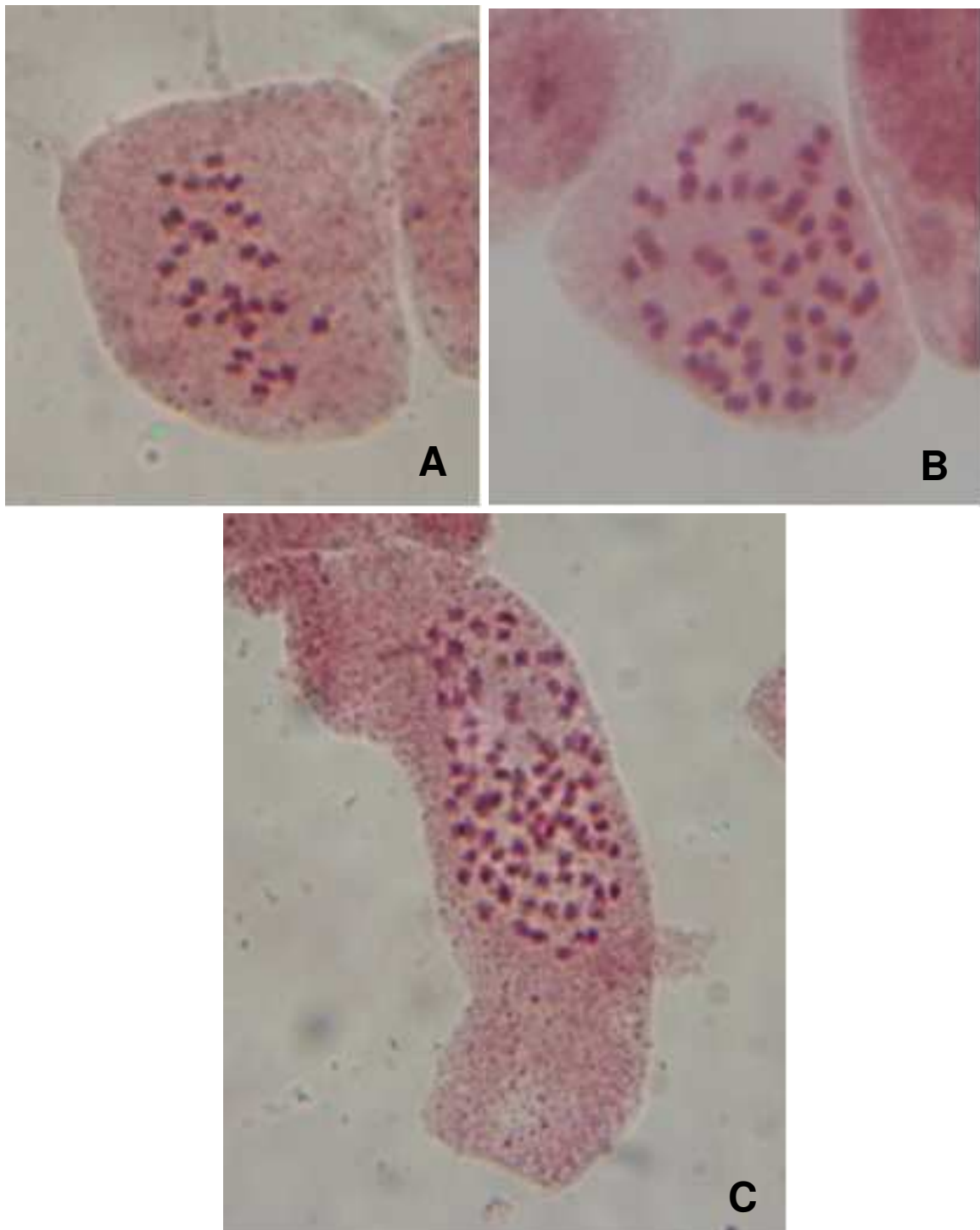


Figura 2. Cromosomas en células meristemáticas de raíz, observadas a 1000 aumentos, de tres de los controles: **(A)**. Control Diploide: CIP 430406 ($2n=2x=30$) cromosomas, **(B)**. Control tetraploide: CIP 430434 ($2n=4x=60$) cromosomas **(C)**. Control hexaploide: CIP 430452

5.2. Viabilidad de polen

El método de aceto-carmín glicerol descrito por Marks (1954) nos dio buenos resultados, pues los granos de polen evaluados presentaron buena coloración. Fueron evaluadas 33 de las entradas, incluyendo solamente los controles diploide y tetraploide. Se establecieron dos clases de grano de polen de acuerdo a su tinción: granos teñidos y granos no teñidos. El polen viable fue aquel que se logró teñir completamente con el colorante, mientras que el polen no viable no se tiño o sólo lo hizo parcialmente (figura 3), se contó aproximadamente 200 granos de polen en cada individuo de cada entrada.

Los individuos evaluados presentaron un rango amplio de viabilidad, con valores que van del 50% (como valor mínimo) al 100% (como máximo), no hubo ningún individuo con una viabilidad por debajo del 50%. Los porcentajes de viabilidad de cada individuo son mostrados en el anexo 9.8. Para una mejor observación de los datos se realizó un diagrama de cajas para los porcentajes de viabilidad de las entradas evaluadas (figura 4). De éste podemos mencionar que la entrada CIP 460431 fue la que presentó los valores más altos de viabilidad, con valores que van desde 98.07% hasta el 100%. Las entradas CIP 460551, CIP 460380, CIP 460375, CIP 460110 y CIP 460232 presentaron cada una un individuo que tenía un valor de viabilidad del 50%, mientras que sus demás individuos poseían valores más altos.

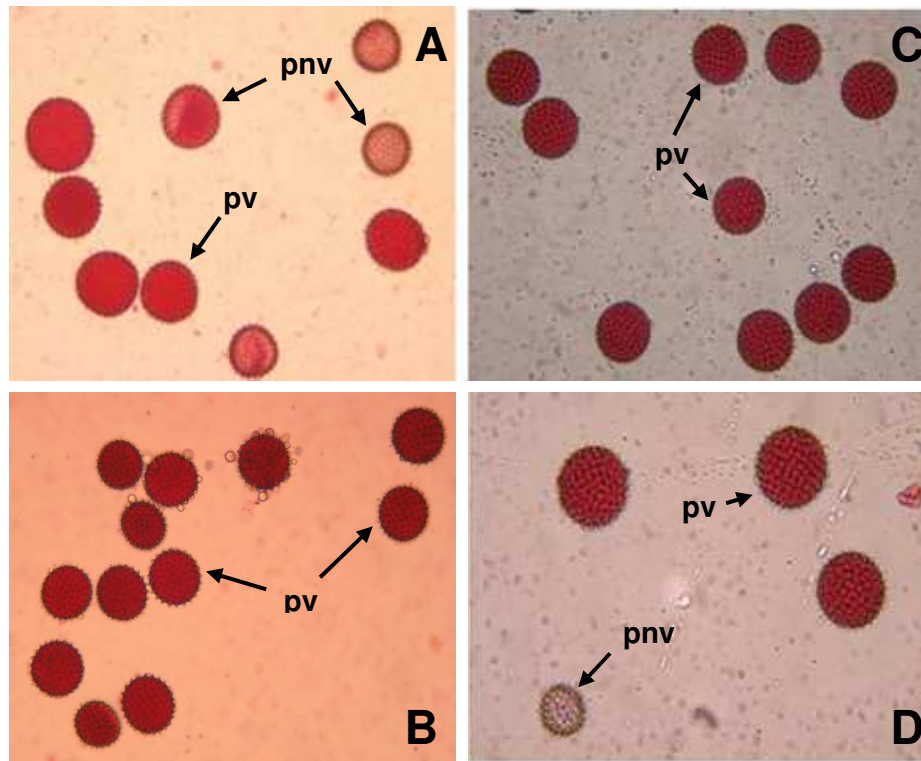


Figura 3. Polen viable (pv) y no viable (pnv) teñidos con aceto-carmin glicerol, observadas a 400 aumentos, en las entradas: **(A)** CIP 460232, **(B)** CIP 460432, **(C)** CIP 460379 y **(D)** CIP 460384. El polen viable es el que esta bien teñido y no deforme.

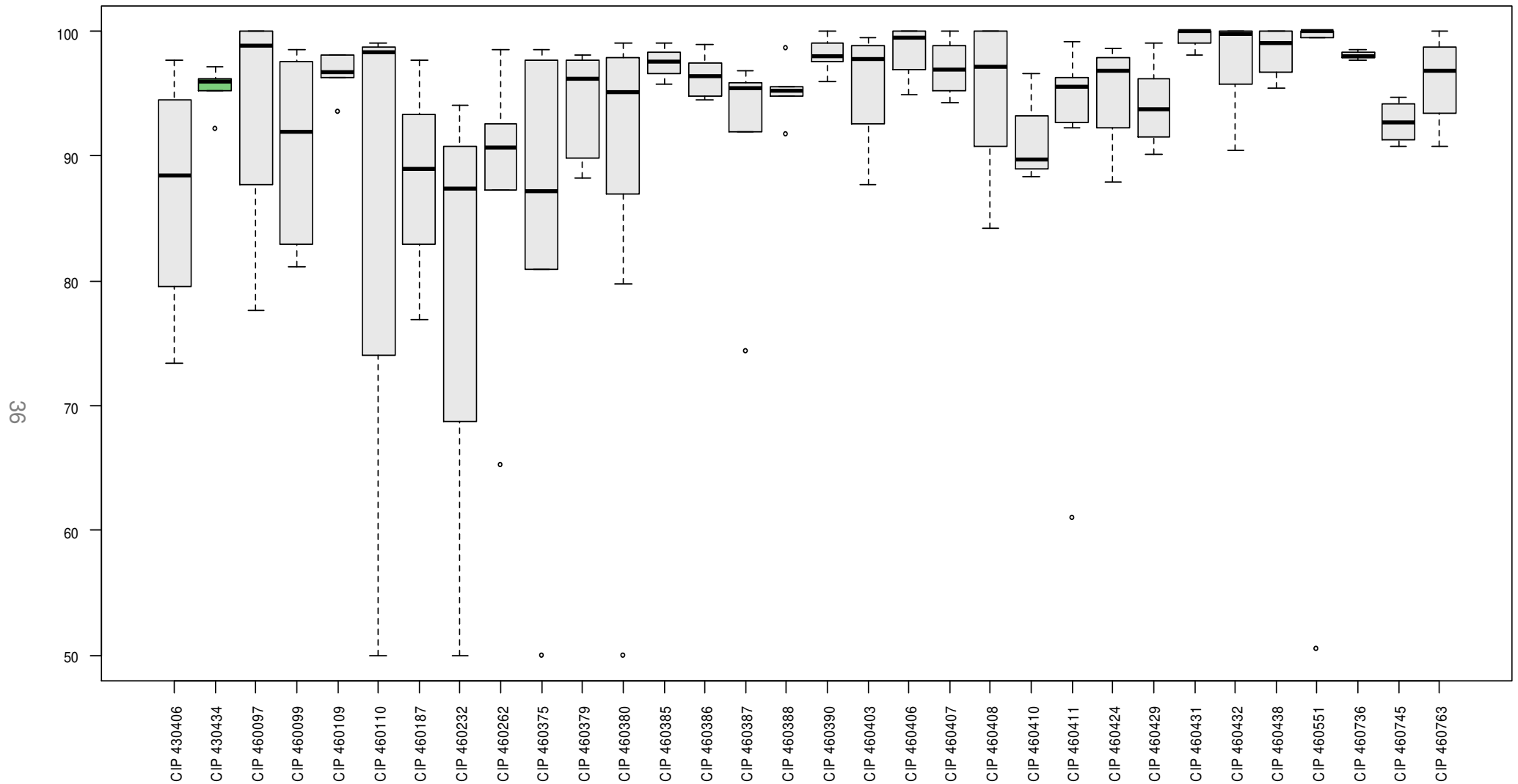


Figura 4. Diagrama de cajas de los porcentajes de viabilidad en las entradas evaluadas. En cada caja se representan los promedios de viabilidad de los individuos de cada entrada. La entrada control tetraploide (CIP 430434) se encuentra representada por la caja de color verde. La mayoría de las entradas presentan una viabilidad mayor al 90%

5.3. Diámetro de polen:

Los resultados de ésta evaluación se encuentran en la tabla 2, en la cual se indican la media, la desviación estándar, el valor mínimo y el valor máximo de diámetro de polen para cada individuo, dentro de cada entrada evaluada. Los 13 valores de diámetro de polen medidos para cada individuo se muestran en el anexo 9.9.

Se hizo un análisis de varianza de factores anidados y una prueba de Tukey con una significancia del 0.05. Los factores en evaluación fueron: entrada e individuo, cada individuo está anidado en cada entrada, cada entrada tenía un número variable de individuos, en los que el valor numérico estaba representado por el diámetro de polen. La tabla de ANOVA (anexo 9.10) nos muestra una probabilidad $p < .0001$, la que al ser comparada con nuestro nivel de significancia del 0.05 nos indica que existen diferencias significativas entre los diámetros de grano de polen en todas las entradas en cuestión (incluyendo los controles) y entre los individuos de las entradas. Por ello se procedió a realizar una prueba de Tukey entre los individuos de cada entrada para determinar cuáles de éstas presentan diferencias significativas en el diámetro de polen entre ellos (tablas 3, 4 y 5). No se presentaron diferencias significativas entre los individuos que conforman cada entrada de los controles (tablas 3, 4 y 5). El análisis de Tukey para las entradas en evaluación (tabla 6) muestra que en 16 de las entradas, al igual que en los controles, no se presentaron diferencias significativas en el diámetro de grano de polen entre sus individuos, mientras que las 14 entradas restantes si las presentaron. Se hizo entonces un nuevo análisis de varianza de factores anidados entre todas las entradas mencionadas que no presentaban diferencias en el diámetro de polen entre sus individuos (entradas homogéneas), incluyendo los controles, para determinar si existen diferencias significativas en el diámetro de grano de polen entre los tres niveles de ploidía. La tabla de ANOVA (anexo 9.11), mostró una probabilidad $p < .0001$, de lo que concluimos

que si existen diferencias significativas entre los diámetros de polen de los tres niveles de ploidía, en las entradas evaluadas. En el agrupamiento que presentan las entradas (tabla 7), se nota que hay variabilidad entre los diámetros de polen de las entradas diploides, a pesar de ello éstas se agrupan con el control diploide y separan de los controles tetraploide y del hexaploide. Podemos notar que hay una relación directa del diámetro de polen con el nivel de ploidía donde a medida que aumenta el nivel de ploidía aumenta el diámetro de polen. Al hacer una correlación del nivel de ploidía con el diámetro de polen el coeficiente de correlación resulta ser: $r=0.9229$, lo cual nos indica que existe buena correlación entre las dos características evaluadas (anexo 9.12).

Considerando el diámetro de polen de todos los individuos de las 30 entradas diploides, excluyendo los granos de polen con genoma duplicado (polen gigante), éste se encontró entre $7.31 \cdot 10^{-2}$ mm como valor mínimo y $11.18 \cdot 10^{-2}$ mm como valor máximo. Estos valores se traslapan con los valores de los tetraploides, que estuvieron entre $9.03 \cdot 10^{-2}$ mm y $10.75 \cdot 10^{-2}$ mm, y el de los individuos hexaploides que estuvieron entre $9.89 \cdot 10^{-2}$ mm y $11.61 \cdot 10^{-2}$ mm.

Tabla 2. Análisis descriptivo del diámetro de polen en cada individuo de las entradas evaluadas y los controles. Para cada individuo se evaluó 13 granos de polen.

Entrada	Ploidía	Individuo	Diámetro promedio de polen (0.01mm)	Desviación Estándar	Diámetro mínimo	Diámetro máximo
CIP 430406	2x	1	8.96	0.39	8.6	9.46
		2	9.00	0.33	8.6	9.46
		3	8.80	0.22	8.6	9.03
		4	8.86	0.33	8.6	9.46
CIP 430434	4x	1	10.22	0.44	9.03	10.75
		2	9.79	0.31	9.46	10.32
		3	10.09	0.45	9.46	10.75
		4	9.79	0.40	9.03	10.32
		5	9.82	0.30	9.46	10.32
CIP 420023	6x	2	10.82	0.34	9.89	11.18
CIP 421123		3	10.92	0.28	10.32	11.18
CIP 430452		1	10.55	0.48	9.89	11.61
CIP 460097	2x	1	8.96	0.24	8.6	9.46
		2	8.37	0.22	8.17	8.6
		3	8.70	0.53	7.31	9.03
		4	8.43	0.28	8.17	9.03
CIP 460099	2x	1	8.40	0.28	8.17	9.03
		2	8.60	0.30	8.17	9.03
		3	8.63	0.28	8.17	9.03
		4	8.37	0.22	8.17	8.6
		5	8.77	0.33	8.17	9.46
CIP 460109	2x	1	8.53	0.16	8.17	8.6
		2	8.80	0.22	8.6	9.03
		3	8.34	0.28	8.17	9.03
		4	8.57	0.33	8.17	9.03
		5	8.63	0.37	8.17	9.46
CIP 460110	2x	1	9.00	0.28	8.6	9.46
		2	8.73	0.21	8.6	9.03
		3	9.13	0.19	9.03	9.46
		4	8.96	0.30	8.6	9.46
CIP 460187	2x	1	8.57	0.33	8.17	9.03
		2	8.10	0.24	7.74	8.6
		3	8.40	0.22	8.17	8.6
CIP 460232	2x	1	8.80	0.28	8.6	9.46
		2	8.04	0.21	7.74	8.17
		3	9.03	0.61	8.17	9.89

Tabla 2. Continuación.

Entrada	Ploidía	Individuo	Diámetro promedio de polen (0.01mm)	Desviación Estándar	Diámetro mínimo	Diámetro máximo
CIP 460262	2x	1	9.86	0.33	9.46	10.32
		2	9.26	0.28	9.03	9.89
		3	9.16	0.32	8.60	9.46
		4	8.53	0.24	8.17	9.03
		5	7.97	0.33	7.74	8.60
CIP 460375	2x	1	9.23	0.28	9.03	9.89
		2	8.93	0.26	8.60	9.46
		3	8.53	0.24	8.17	9.03
		4	9.03	0.30	8.60	9.46
		5	8.77	0.28	8.17	9.03
CIP 460379	2x	1	9.10	0.30	8.60	9.46
		2	8.83	0.22	8.60	9.03
		3	8.93	0.26	8.60	9.46
		4	9.10	0.24	8.60	9.46
		5	8.90	0.27	8.60	9.46
		6	9.20	0.22	9.03	9.46
CIP 460380	2x	1	8.80	0.22	8.60	9.03
		2	8.63	0.21	8.17	9.03
		3	8.50	0.19	8.17	8.60
		4	8.43	0.28	8.17	9.03
		5	8.86	0.22	8.60	9.03
		6	8.86	0.22	8.60	9.03
		7	8.63	0.21	8.17	9.03
CIP 460385	2x	1	9.10	0.34	8.60	9.89
		2	9.33	0.21	9.03	9.46
		3	8.27	0.26	7.74	8.60
		4	8.86	0.22	8.60	9.03
		5	8.90	0.21	8.60	9.03
		6	9.13	0.31	8.60	9.46
		7	8.83	0.38	8.17	9.46
CIP 460386	2x	1	8.80	0.22	8.60	9.03
		2	9.10	0.24	8.60	9.46
		3	8.93	0.31	8.60	9.46
		4	8.73	0.44	8.17	9.46
		5	9.16	0.21	9.03	9.46
		6	8.86	0.45	8.17	9.46
		7	10.52	0.42	9.46	10.75
		8	8.96	0.34	8.60	9.46

Tabla 2. Continuación.

Entrada	Ploidía	Individuo	Diámetro promedio de polen (0.01mm)	Desviación Estándar	Diámetro mínimo	Diámetro máximo
CIP 460387	2x	1	8.83	0.28	8.60	9.46
		2	9.06	0.33	8.60	9.46
		3	8.96	0.34	8.60	9.46
		4	8.50	0.26	8.17	9.03
		5	8.90	0.27	8.60	9.46
		6	9.13	0.31	8.60	9.46
CIP 460388	2x	1	8.73	0.21	8.60	9.03
		2	9.29	0.28	8.60	9.46
		3	9.33	0.59	8.60	9.89
		4	8.90	0.37	8.17	9.46
		5	9.49	0.33	9.03	9.89
		6	9.03	0.58	8.60	9.89
CIP 460390	2x	1	9.23	0.22	9.03	9.46
		2	9.16	0.32	8.60	9.46
		3	8.93	0.26	8.60	9.46
		4	9.13	0.40	8.60	9.46
		5	9.00	0.28	8.60	9.46
CIP 460403	2x	1	8.83	0.22	8.60	9.03
		2	9.20	0.37	8.60	9.89
		3	9.03	0.25	8.60	9.46
		4	9.06	0.33	8.60	9.46
CIP 460406	2x	1	9.00	0.28	8.60	9.46
		2	8.80	0.33	8.17	9.46
		3	8.63	0.12	8.60	9.03
		4	8.77	0.45	8.17	9.46
CIP 460407	2x	1	8.83	0.28	8.60	9.46
		2	8.90	0.27	8.60	9.46
		3	8.73	0.21	8.60	9.03
		4	9.49	0.37	9.03	9.89
CIP 460408	2x	1	9.49	0.48	8.60	9.89
		2	9.10	0.24	8.60	9.46
		3	9.10	0.39	8.60	9.46
		4	9.13	0.31	8.60	9.46
		5	8.60	0.30	8.17	9.03
		6	8.60	0.25	8.17	9.03
		7	9.10	0.30	8.60	9.46
		8	8.10	0.24	7.74	8.60
		9	9.03	0.35	8.60	9.89
		10	9.59	0.51	9.03	10.32
CIP 460410	2x	1	8.57	0.12	8.17	8.60
		2	9.63	0.37	9.03	10.32
		3	9.39	0.34	9.03	9.89

Tabla 2. Continuación.

Entrada	Ploidía	Individuo	Diámetro promedio de polen (0.01mm)	Desviación Estándar	Diámetro mínimo	Diámetro máximo
CIP 460411	2x	1	8.77	0.28	8.60	9.46
		2	10.55	0.22	10.32	10.75
		3	10.45	0.48	9.46	11.18
		4	9.23	0.28	8.60	9.46
		5	9.00	0.33	8.17	9.46
		6	8.86	0.41	8.60	9.89
		7	8.96	0.24	8.60	9.46
CIP 460424	2x	1	9.03	0.35	8.60	9.46
		2	8.93	0.36	8.60	9.46
		3	8.77	0.22	8.60	9.03
		4	9.13	0.26	8.60	9.46
CIP 460429	2x	1	8.50	0.31	7.74	9.03
		2	8.43	0.28	8.17	9.03
		3	8.34	0.22	8.17	8.60
		4	8.27	0.36	7.74	8.60
		5	8.73	0.27	8.17	9.03
		6	8.70	0.40	8.17	9.46
CIP 460431	2x	1	8.67	0.16	8.60	9.03
		2	9.36	0.26	8.60	9.46
		3	9.00	0.21	8.60	9.46
		4	8.83	0.38	8.17	9.46
		5	9.72	0.22	9.46	9.89
		6	8.83	0.28	8.17	9.03
		7	8.77	0.28	8.17	9.03
CIP 460432	2x	1	9.86	0.41	9.46	10.32
		2	8.83	0.22	8.60	9.03
		3	8.67	0.24	8.17	9.03
		4	9.26	0.33	8.60	9.89
		5	8.70	0.26	8.17	9.03
		6	9.23	0.22	9.03	9.46
CIP 460438	2x	1	8.70	0.44	8.17	9.46
		2	8.27	0.44	7.74	9.03
		3	9.20	0.51	8.60	9.89
		4	8.14	0.28	7.74	8.60
CIP 460551	2x	1	9.59	0.64	8.60	10.75
		2	10.68	0.42	9.89	11.18
		3	8.53	0.30	8.17	9.03
		4	9.10	0.46	7.74	9.46
		5	9.39	0.46	8.60	9.89
		6	10.45	0.37	9.46	10.75

Tabla 2. Continuación.

Entrada	Ploidía	Individuo	Diámetro promedio de polen (0.01mm)	Desviación Estándar	Diámetro mínimo	Diámetro máximo
CIP 460736	2x	1	8.60	0.00	8.60	8.60
		2	8.80	0.28	8.60	9.46
		3	8.73	0.32	8.17	9.03
		4	8.70	0.26	8.17	9.03
CIP 460745	2x	1	9.86	0.37	9.46	10.32
		2	9.20	0.33	8.60	9.46
		3	8.77	0.22	8.60	9.03
		4	10.02	0.21	9.89	10.32
CIP 460763	2x	1	8.80	0.22	8.60	9.03
		2	9.00	0.21	8.60	9.46
		3	8.50	0.36	8.17	9.03
		4	8.90	0.32	8.60	9.46

Tabla 3. Comparación del diámetro de polen de los individuos en los controles hexaploides. Se observa homogenidad entre los individuos según la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$)

Entrada	Nº Individuo	Diferencia de medias (estimada)	Tukey
CIP 420023	1	25.3	a
CIP 421123	2	25.4	a
CIP 430452	3	24.5	a

Tabla 4. Comparación del diámetro de polen de los individuos en los controles tetraploides. Se observa homogenidad entre los individuos según la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$)

Entrada	Nº Individuo	Diferencia de medias (estimada)	Tukey
CIP 430434	1	24.0	a
	2	23.3	a
	3	22.8	a
	4	22.8	a
	5	22.7	a

Tabla5. Comparación del diámetro de polen de los individuos del control diploide. Se observa homogenidad entre los individuos según la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$)

Entrada	Nº Individuo	Diferencia de medias (estimada)	Tukey
CIP 430406	1	21.40	a
	2	21.00	a
	3	20.90	a
	4	20.40	a

Tabla 6. Comparación del diámetro de polen en los individuos de las entradas diploides evaluadas. Se aplicó la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para determinar la homogeneidad entre los individuos de cada entrada.

Entrada	Nº Individuo	Diferencia de medias (estimada)	Tukey/Entrada
CIP 460097	1	20.80	a
	2	19.80	a
	3	19.70	a
	4	19.50	a
CIP 460099	1	20.40	a
	2	20.10	a
	3	20.00	a
	4	19.60	a
	5	19.30	a
CIP 460109	1	20.40	a
	2	20.10	a
	3	19.90	a
	4	19.80	a
	5	19.20	a
CIP 460110	1	21.30	a
	2	21.00	a
	3	20.90	a
	4	20.30	a
CIP 460187	1	19.70	a
	2	19.50	a
	3	18.80	a
CIP 460232	1	20.80	a
	2	20.50	ab
	3	18.70	b
CIP 460262	1	23.00	a
	2	21.40	ab
	3	21.30	ab
	4	19.80	bc
	5	18.30	c
CIP 460375	1	22.30	a
	2	20.90	ab
	3	20.80	ab
	4	20.40	b
	5	19.80	b
<u>CIP 460379</u>	1	21.80	a
	2	21.70	a
	3	21.40	a
	4	21.30	a
	5	20.80	a
	6	20.50	a

Tabla 6. Continuación

Entrada	Nº Individuo	Diferencia de medias (estimada)	Tukey/Entrada
<u>CIP 460380</u>	1	20.70	a
	2	20.50	a
	3	20.40	a
	4	20.20	a
	5	20.10	a
	6	19.80	a
	7	19.70	a
CIP 460385	1	21.70	a
	2	21.30	a
	3	21.20	a
	4	20.70	ab
	5	20.60	ab
	6	20.60	ab
	7	19.30	b
CIP 460386	1	24.40	a
	2	21.30	b
	3	21.20	b
	4	21.00	b
	5	20.80	b
	6	20.50	b
	7	20.40	b
	8	20.40	b
CIP 460387	1	21.50	a
	2	21.20	ab
	3	20.90	ab
	4	20.70	ab
	5	20.50	ab
	6	19.80	b
CIP 460388	1	22.60	a
	2	22.10	ab
	3	21.70	abc
	4	21.60	abc
	5	20.70	bc
	6	20.30	c
CIP 460390	1	21.70	a
	2	21.50	a
	3	21.30	a
	4	20.80	a
	5	20.80	a
CIP 460403	1	21.30	a
	2	21.30	a
	3	21.00	a
	4	20.60	a

Tabla 6. Continuación.

Entrada	Nº Individuo	Diferencia de medias (estimada)	Tukey/Entrada
CIP 460406	1	20.90	a
	2	20.40	a
	3	20.40	a
	4	20.10	a
CIP 460407	1	22.00	a
	2	20.60	ab
	3	20.50	ab
	4	20.30	b
CIP 460408	1	22.40	a
	2	22.00	a
	3	21.90	ab
	4	21.20	abc
	5	21.10	abc
	6	21.10	abc
	7	21.00	abc
	8	20.00	bcd
	9	20.00	cd
	10	18.80	d
CIP 460410	1	22.90	a
	2	21.90	a
	3	19.90	b
CIP 460411	1	26.08	a
	2	24.83	a
	3	22.50	b
	4	20.92	bce
	5	20.83	cde
	6	20.67	de
	7	20.25	e
CIP 460424	1	21.30	a
	2	20.80	a
	3	20.70	a
	4	20.30	a
CIP 460429	1	20.30	a
	2	20.30	a
	3	19.80	a
	4	19.60	a
	5	19.30	a
	6	19.20	a

Tabla 6. Continuación.

Entrada	Nº Individuo	Diferencia de medias (estimada)	Tukey/Entrada
CIP 460431	1	22.80	a
	2	21.80	ab
	3	20.90	bc
	4	20.60	bc
	5	20.50	bc
	6	20.30	bc
	7	20.10	c
CIP 460432	1	23.00	a
	2	21.60	ab
	3	21.40	abc
	4	20.60	bc
	5	20.30	bc
	6	19.80	c
CIP 460438	1	21.30	a
	2	20.10	ab
	3	19.30	b
	4	18.90	b
CIP 460551	1	26.20	a
	2	24.80	a
	3	22.20	b
	4	21.80	b
	5	21.20	bc
	6	19.80	c
CIP 460736	1	20.50	a
	2	20.30	a
	3	20.30	a
	4	20.00	a
CIP 460745	1	23.70	a
	2	22.90	ab
	3	21.70	bc
	4	20.40	c
CIP 460763	1	20.90	a
	2	20.80	a
	3	20.40	a
	4	19.80	a

* Las entradas subrayadas presentaron sólo algunos granos de polen cuyo diámetro salía de lo predominante por ello fueron excluidos dichos valores. Por ello resultaron homogéneas con la prueba de Tukey y fueron consideradas como tales.

Tabla 7. Relación del nivel de ploidía y diámetro de polen de las 16 entradas homogéneas evaluadas (en negrita). Los controles se encuentran marcados con asterisco. Se muestra los resultados de la prueba de Tukey con 0.05 de nivel de significancia.

	Entrada	Nº Individuos	Diámetro de polen (mm*10-2)	Nivel de ploidía	Prueba de Tukey			
1	CIP 420023 *	1	10.9	6x	A			
2	CIP 421123 *	1	10.8	6x	A			
3	CIP 430452 *	1	10.6	6x	A			
4	CIP 430434 *	5	9.9	4x	B			
5	CIP 460410	3	9.2	2x	C			
6	CIP 460390	5	9.1	2x	D	C		
7	CIP 460403	4	9.0	2x	D	C	E	
8	CIP 460379	6	9.0	2x	D	C	E	
9	CIP 460424	4	9.0	2x	D	C	E	
10	CIP 460110	4	9.0	2x	D	C	E	
11	CIP 460386	7	8.9	2x	D	F	C	E
12	CIP 430406 *	4	8.9	2x	D	F	C	E
13	CIP 460406	4	8.8	2x	D	F	C	E
14	CIP 460763	4	8.8	2x	D	F	C	E
15	CIP 460736	4	8.7	2x	D	F	C	E
16	CIP 460380	7	8.7	2x	D	F	C	E
17	CIP 460097	4	8.6	2x	D	F	C	E
18	CIP 460109	5	8.6	2x	D	F	E	
19	CIP 460099	5	8.6	2x	D	F	E	
20	CIP 460429	6	8.5	2x	F			E
21	CIP 460187	3	8.4	2x	F			

5.3.1. Frecuencia de polen gigante

Se consideró como polen gigante aquellos granos de polen que presentaban un diámetro mayor que el 30% del diámetro del grano de polen promedio (figura 5 y anexo 9.13). Se encontró que solamente 7, de las 30 entradas diploides evaluadas, presentaron entre 10% y 40% de individuos productores de polen gigante. No se encontró polen gigante en ninguna de las entradas control. Los porcentajes de producción de polen gigante por individuo estuvieron entre 0.04% y 2.37%. En la tabla 8 se muestran las entradas productoras de polen gigante y sus respectivos porcentajes de producción. Tres de las entradas evaluadas presentaron dos individuos productores de polen gigante y las entradas restantes presentaron sólo un individuo productor.

Con la finalidad de evidenciar la relación entre polen gigante y algunas irregularidades meióticas, como son la producción de díadas y tríadas, se observó las células madres de las microsporas de la entrada CIP 460411. Efectivamente se observó la presencia de díadas y tríadas (figura 5), justificando la producción de polen gigante (Becerra y Orjeda, 2002; Orjeda, 1995). Dicha entrada fue la que presentó un mayor porcentaje de producción de polen gigante (2.37%), por ello fue utilizada para graficar la distribución de frecuencias del diámetro de polen. Para hacer dicha gráfica se consideraron los datos de 4 individuos sumando un total de 100 granos de polen. Se notó que dicha distribución tiende a ser bimodal con dos poblaciones de diámetro de polen (figura 6), lo que expresa la producción de dos tipos de polen, que pueden ser n y $2n$. Se hizo también la distribución de frecuencias de la entrada CIP 460109 (entrada no productora de polen gigante), tomándose los datos de 5 individuos sumando un total de 100 granos de polen, dicha gráfica se asemeja a una distribución normal, presentando una sola moda (figura 6)

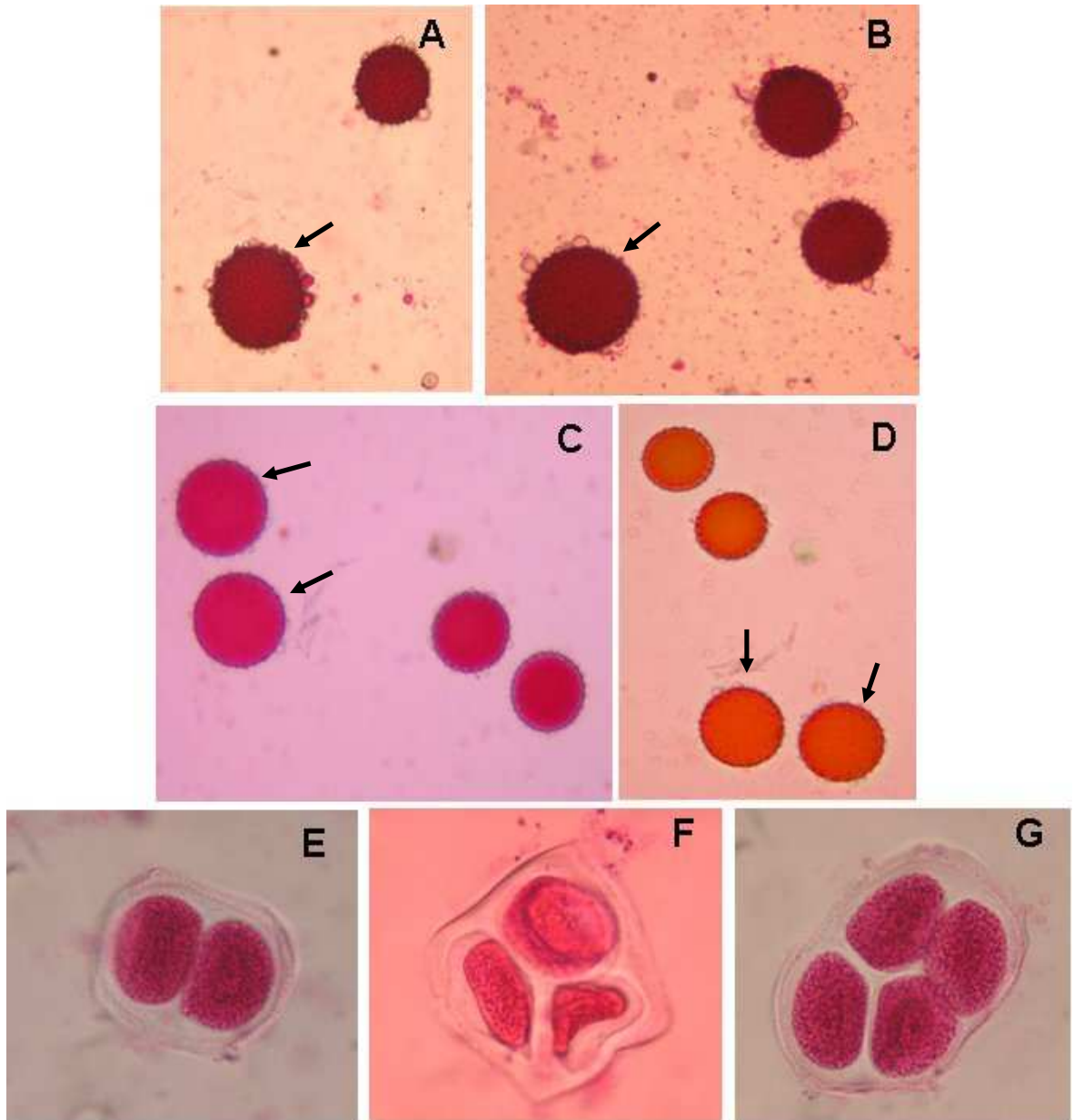


Figura 5. Polen $2n$ en la entrada CIP 460431 **(A)** y **(B)** . Polen gigante en las entradas CIP 460432 y CIP 460375 **(C)** y **(D)** respectivamente. Los granos de polen gigante son indicados por una flecha y todas las observaciones son con 100 aumentos. Además se muestra una díada **(E)**, una tríada **(F)** y una tétrada **(G)** en la entrada CIP 460431, todas observadas a 400 aumentos..

Tabla 8. Porcentajes de la producción de polen gigante en las 7 entradas productoras. Se indican sólo los individuos donde se encontró producción de este tipo de polen

Entrada	Nº Individuo	Porcentaje de polen 2n
CIP 460375	1	0.28
	2	0.34
CIP 460379	1	0.04
CIP 460380	1	0.40
	2	0.24
CIP 460408	1	0.39
CIP 460411	1	2.37
CIP 460431	1	0.49
CIP 460432	1	0.74
	2	0.43

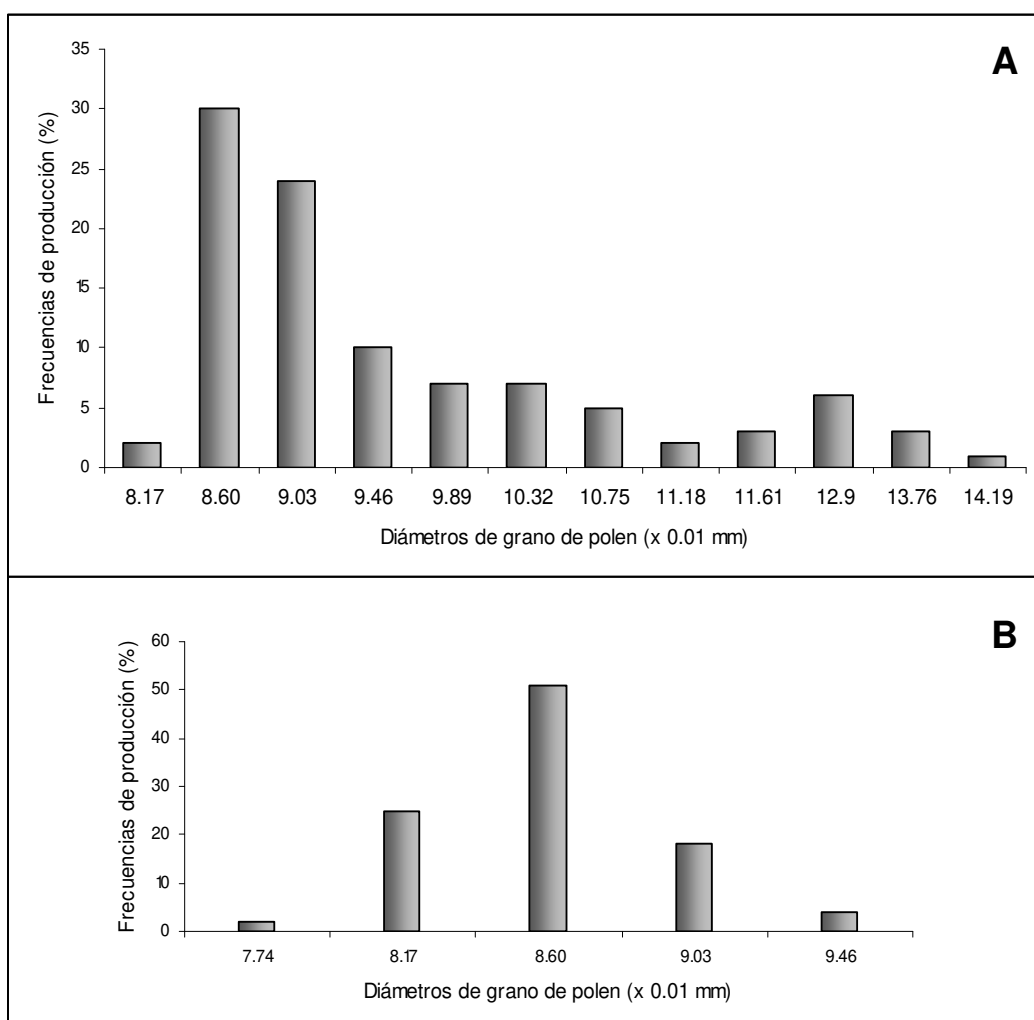


Figura 6. Distribución de frecuencias de diámetro de polen en la entrada no homogénea CIP 460411. Se puede observar que se definen dos poblaciones de grano de polen, lo que evidencia la producción de polen gigante **(A)**. Distribución de frecuencias del diámetro de polen en la entrada homogénea CIP 460109 la cual es unimodal **(B)**.

VI. DISCUSIÓN

6.1. Niveles de Ploidía

Al evaluar el nivel de ploidía en 39 entradas de *Ipomoea trifida* de 6 países: México, Colombia, Cuba, Guatemala, Nicaragua, y Venezuela, siendo la mayoría provenientes de Nicaragua, mediante el conteo de cromosomas en meristemo apical de raíz se encontró solamente un nivel de ploidía: El nivel diploide, con $2n=2x=30$ cromosomas. Las entradas evaluadas, fueron anteriormente identificadas como *I. trifida* por Daniel Austin, Fermín de la Puente y otros investigadores, según figura en las muestras del Herbario del Centro Internacional de la Papa. No se encontró otro nivel de ploidía, como ha sido reportado por muchos investigadores, que mencionan que *I. trifida* es poliploide con niveles del diploide al hexaploide (Srisuwan *et al.*, 2006; Ozias-Akins y Jarret, 1994; Kobayashi, 1984; Teramura 1979; Nishiyama, 1975; Nishiyama *et al.*, 1975; Nishiyama, 1971), para entradas con amplio rango de distribución.

La literatura acerca de los niveles de ploidía reportados para *I. trifida*, superiores al diploide, ha tenido, innumerables veces, problemas de identificación taxonómica; esto debido a que los marcadores morfológicos usados para distinguir una especie de otra sufren constante variación (Kobayashi, 1984). Otro de los problemas que puede haber contribuido a dar un incorrecto nivel de ploidía en las especies de la Serie Batatas, es que pueden ser fácilmente cruzadas produciendo tipos intermedios entre ellas (Austin, 1977; Kobayashi, 1984). Austin (1987) mencionó que *I. trifida* podría tener razas diploides y tetraploides, pero lo dijo basándose solamente en la longitud de los estomas, el cual no es un factor determinante del nivel de ploidía. Kobayashi

(1984) considera que existe material tetraploide de *I. trifida* y que estos son ecotipos de ella, considera también que los individuos tetraploides y hexaploides de *I. trifida* podrían haberse producido a partir de individuos diploides, tratándose de diferentes ecotipos adaptados cada uno a diferentes medios. Él sugiere llamarle a todo este grupo de plantas: "Complejo *Ipomoea trifida*". Además, menciona que individuos triploides han sido encontrados y esto se debe a que existe gran densidad de representantes tanto diploides como tetraploides en la naturaleza. Nishiyama (1959) reportó la entrada K123 como *I. trifida* hexaploide ($2n=6x=90$ cromosomas), pues presentaba características morfológicas diferentes de *I. batatas*, como la ausencia de raíz reservante, tallos delgados, hábito trepador, entre otras. Lo expuesto por Nishiyama fue luego refutado por Jones (1967, 1970) quién comparó las características morfológicas de K123 con *I. batatas*, notando que las características de ésta también la presentaban algunas entradas de *I. batatas*. Hizo también comparaciones relacionadas a la fertilidad, notando que la cruzabilidad entre K123 e *I. batatas* era alta; además de consideraciones citológicas encontrando que en los híbridos los cromosomas de K123 con *I. batatas* presentaban apareamiento en metafase I, similar a lo observado entre representantes de *I. batatas*. Concluyendo entonces que K123 era un segregante extremo de *I. batatas* y no *I. trifida* silvestre. A pesar de lo expuesto anteriormente, K123 ha sido considerado como *I. trifida* (6x) innumerables veces (Oración, 1990; Shiotani *et al.*, 1994; Shiotani y Kawase, 1989; Nishiyama, 1971; Nishiyama, 1959; Nishiyama y Teramura, 1962; Teramura, 1979; Nishiyama *et al.*, 1975; Shiotani y Kawase, 1989).

Investigadores japoneses han hecho colectas en las regiones del Caribe, que es donde se encuentra distribuida *I. trifida*, muchos de éstos individuos colectados fueron identificados como *I. trifida* por Nishiyama (1971) y Kobayashi (1984), quienes consideraron que todo material tetraploide colectado era

representante de *I. trifida*, generados por autoploidía. Austin (1977) mencionó que dichas plantas tetraploides podrían tener su origen de cruces interespecíficos entre *I. batatas* (6x) e *I. trifida* (2x). Ozias-Akins y Jarret (1994) también encontraron *I. trifida* tetraploides, pero hicieron la salvedad que dicho material está en constante revisión taxonómica.

Los errores de identificación taxonómica no sólo han incluido a *I. trifida* e *I. batatas*, sino también a otras especies de la serie. Así tenemos que Martín y Jones (1972), Jones (1970) y Ting *et al.* (1957), describieron una *Ipomoea* tetraploide como *I. gracilis* o *I. littoralis*, la cual no pertenecía a ninguna de las dos especies, sino mas bien parecía tratarse de un híbrido interespecífico entre *I. batatas* (6x) y un silvestre diploide, posiblemente *I. trifida* (2x) (Austin, 1977). Del mismo modo Nishiyama (1971) y Jones (1970) tuvieron un error de identificación, identificaron una entrada tetraploide como *I. littoralis*, lo cuál no fue correcto, pues dicha especie posee un nivel de ploidía diploide ($2n=2x=30$ cromosomas) (Jarret *et al.*, 1992). Igualmente, como en los casos anteriores, material diploide proveniente de México fue confundido como *I. leucantha*, el cuál fue luego identificado como *I. trifida* diploide por comparación con muestras de herbarios (Kobayashi, 1984).

Muchos investigadores consideraron que *I. batatas* solamente poseía un nivel de ploidía: el hexaploide ($2n=6x=90$) y que *I. trifida* poseía los demás niveles del diploide al hexaploide (Shiotani *et al.*, 1994; Orjeda *et al.*, 1991; Freyre *et al.*, 1990; Orjeda *et al.*, 1990; Oración *et al.*, 1990; Shiotani *et al.*, 1994; Shiotani y Kawase, 1989; Nishiyama, 1971). Esto fue refutado por Austin (1987) quien sugirió que *I. batatas* posee dos niveles de ploidía: tetraploide y hexaploide. Posteriormente se fueron identificando más entradas tetraploides, antes identificadas como *I. trifida*, que resultaron ser realmente *I. batatas*. MacDonald y Austin (1990) describieron una de éstas entradas, proveniente de

Veracruz, México, la cual fue nominada como *I. batatas* var. *apiculata*. Dicha entrada era idéntica a *I. gracilis* (K134), descrita por Martin y Jones (1972), Jones (1970) y Ting *et al.* (1957); a *I. littoralis* (K233) descrita por Nishiyama (1963); a *I. trifida* descrita por Shiotani y Kawase (1989) y como *I. batatas* descrita por Austin (1987) y Jones (1990). Bohac *et al.* (1993) y Jarret *et al.* (1992) sugirieron que K233 era un segregante de *I. batatas* var. *apiculata* el cual es tetraploide. Este mismo problema de identificación ocurrió con material tetraploide colectado en Perú, que fue en un principio identificado como *I. tiliacea* y luego corregido por Austin (1985) como *I. batatas*.

En relación a esto, Austin (1978) determinó que la forma de los sépalos y tubo de la corola, son el mejor criterio taxonómico para diferenciar entre especies de la sección Batatas. Basados en dicho criterio Bohac *et al.* (1993) hicieron una revisión taxonómica de entradas tetraploides previamente identificadas como *I. trifida*, por otros investigadores (que pasaron por alto el criterio definido por Austin), y las redefinieron como *I. batatas* tetraploides. Ellos compararon dichas entradas con *I. batatas* ($2n=6x=90$) e *I. trifida* ($2n=2x=30$), encontrando que su forma de sépalo y tubo de la corola tenían estrecha similitud con *I. batatas* y no con *I. trifida*. Además no encontraron ninguna *I. trifida* tetraploide como esperaban por el amplio rango de distribución evaluado, pero encontraron una entrada que parecía ser un híbrido entre *I. batatas* e *I. trifida*, que fue anteriormente reportado por Jones (1970) como *I. gracilis*, mientras que Austin (1977) ya lo había considerado un híbrido; lo cuál es respaldado porque no se han obtenido semillas de dicha entrada en muchos años (Bohac *et al.*, 1993). Probablemente en entradas reportadas como *I. trifida* tetraploide se encuentren algunas *I. batatas* y otras que sean híbridos entre *I. batatas* e *I. trifida*, pues la hibridización entre ambas especies es posible (Orjeda *et al.*, 1991; Oración *et al.*, 1990; Austin, 1977). Oracion *et al.* (1990) mostró que las barreras reproductivas

entre *I. trifida* 2x e *I. batatas* 6x no son fuertes y pueden ocurrir en condiciones naturales. En muchas investigaciones se ha considerado que todo material que resultaba ser tetraploide se trataba de *I. trifida* (Srisuwan *et al.*, 2006, Shiotani *et al.*, 1994; Orjeda *et al.*, 1991; Freyre *et al.*, 1990; Orjeda *et al.*, 1990; Oración *et al.*, 1990; Shiotani *et al.*, 1994; Shiotani y Kawase, 1989; Nishiyama, 1971), sin tomar en cuenta los marcadores morfológicos mencionados por Austin (1978). Uno de estos ejemplos es el de Srisuwan *et al.* (2006), que citaron erróneamente a la entrada 81.2 como *I. trifida* tetraploide siendo ésta anteriormente reconocida como *I. batatas* tetraploide (Jones, 1990; Becerra, 1995; Becerra y Orjeda, 2002), además de otras entradas, que tampoco se había confirmado su especie. Esto los podría haber llevado a la conclusión errónea que las entradas tetraploides que evaluaron se encuentran más relacionadas a *I. batatas* que las demás *Ipomoea*, incluso que *I. tabascanana* que ha sido considerada un híbrido natural entre *I. batatas* e *I. trifida* (Rajapakse *et al.*, 2004). Más bien dichas entradas tetraploides podrían ser *I. batatas* 4x o híbridos interespecíficos.

Se puede notar que realizar estudios tanto en citología, para la determinación de los niveles de ploidía, como taxonómicos y moleculares, serían indispensables para poder determinar con seguridad si *I. trifida* posee razas tetraploides o hexaploides.

6.2. Viabilidad del polen

La viabilidad obtenida por la mayoría de las entradas evaluadas en el presente trabajo fue relativamente alta (>90%). Aunque en cada una de 5 entradas hubo un individuo que presentaron una viabilidad baja (50%), probablemente se deba a que cada individuo se trata de un genotipo diferente el

cual interactúa independientemente con el ambiente, y la viabilidad del polen puede verse afectada por éste. Así también, Méndez (1995) encontró en *Ipomoea* que la fertilidad masculina puede ser variable entre individuos diferentes, él concluyó que el porcentaje de viabilidad puede verse afectado por cada genotipo y por el medio ambiente. Ello puede explicar nuestros resultados de porqué sólo un individuo de las entradas CIP 460551, CIP 460380, CIP 460375, CIP 460110 y CIP 460232 presentó 50% de viabilidad. Por otro lado, Orjeda (1990) notó que la viabilidad puede mejorar de un ambiente a otro, pues ella comparó dos ambientes diferentes como La Molina - Lima y San Ramón, encontrando que hubo mayor viabilidad en San Ramón.

Se puede señalar que la viabilidad del polen no sería un buen indicador del nivel de ploidía (Méndez, 1995), tal y como ocurrió en la muestra evaluada. Aunque puede encontrarse, que cuando el polen presenta apariencia infértil, éste puede corresponder a individuos triploides (Orjeda *et al.*, 1990; Orjeda, 1990) a diferencia de los diploides, tetraploides y hexaploides en los cuáles el polen es fértil

6.3. Diámetro del grano de polen.

Freyre (1989), Orjeda *et al.*, (1990) y Orjeda (1995) encontraron que en *Ipomoea* el diámetro de grano de polen aumenta a medida que el nivel de ploidía es mayor, esto también ha sido reportado en otras especies: Jones *et al.* (2007), encontró en *Hydrangea macrophylla* que los individuos diploides tienen menor tamaño de polen que los tetraploides, en *Avena* se da una buena correlación entre cuatro niveles de ploidía desde el nivel diploide al octoploide (Katsiotis y

Forsberg, 1995), en *Ollucus* también se presentan diferencias entre los niveles de ploidía (Mendez, 1995).

El rango de longitud del diámetro de polen del material diploide evaluado estaba entre 7.31×10^{-2} mm y 11.61×10^{-2} mm, mientras que Orjeda *et al.* (1990) reportaron que éste se encontraba entre 7.62×10^{-2} mm y 9.05×10^{-2} mm y Díaz e Iwanaga (1989) mencionaron que se encuentra entre de 7.57×10^{-2} mm y 8.48×10^{-2} mm. Para los tetraploides Orjeda *et al.* (1990) encontraron el valor de diámetro cercano a 9.5×10^{-2} mm, mientras que Díaz e Iwanaga (1989) lo reportaron entre 8.89×10^{-2} mm y 10.095×10^{-2} mm. El rango de diámetro de polen en las entradas estudiadas en el presente trabajo fue más amplio que los reportados por Orjeda *et al.* (1990) y por Díaz e Iwanaga (1989), esto puede deberse a que se evaluó una mayor cantidad de entradas en las que se expresó más ampliamente la variabilidad de la especie indicándonos un mayor rango del diámetro de polen. Además es conocido que el diámetro de grano de polen puede variar entre los genotipos de una entrada (Becerra, 1995).

Becerra (1995) y Orjeda *et al.* (1990) notaron que el diámetro de grano de polen tiene distribución normal por ello se pudo realizar una prueba de análisis de varianza. Al realizar ésta se encontró diferencias significativas no sólo entre las diferentes entradas, sino también entre los individuos de cada una. Por la prueba de Tukey se agrupó separadamente cada nivel de ploidía, mostrándonos que hay diferencias entre ellos para la característica evaluada. Esto posiblemente se debió a que sólo tomamos las entradas en las que no había diferencias significativas entre los diámetros de grano de polen entre sus individuos. Sin embargo catorce entradas diploides sí presentaron diferencias significativas entre los individuos que las conforman, lo cuál se explica porque dentro de la especie fue reportado que pueden existir dos poblaciones de grano de polen, debido a la formación de polen gigante (Becerra y Orjeda, 2002;

Becerra, 1995; Orjeda, 1990), además las entradas evaluadas provienen de colectas originales con polinización abierta, pudiendo ello conferirles variabilidad en el diámetro de polen. Dichas entradas presentaron algunos valores más altos que el valor promedio formando otra población alejada éste, lo cual puede tener relación con la producción de polen gigante (figura 6). Esta característica genera que se presente variabilidad en el diámetro de polen entre los individuos de una misma entrada y a su vez producir su rango sea amplio y se traslape con los diámetros de niveles de ploidía superiores.

Se puede señalar entonces que el diámetro de polen se encuentra asociado con el nivel de ploidía cuando las entradas evaluadas presentan homogeneidad entre los diámetros de polen de sus individuos. Pero no es un factor determinante para inferir el nivel de ploidía cuando se incluye entradas cuyos individuos tienen valores de diámetro de polen no homogéneos, pues algunos de estos valores se traslapan con los controles tetraploide y hexaploide.

6.3.1. Frecuencia de polen gigante

Se ha encontrado que en *Ipomoea* se puede relacionar directamente la producción de granos de polen gigante con la producción de gametos no reducidos: polen $2n$ (Becerra y Orjeda, 2002; Becerra, 1995; Orjeda *et al.*, 1990; Orjeda, 1990; Díaz e Iwanaga, 1989). Se conocen ciertas características que indican que dicho tipo de polen podría tratarse de polen $2n$ (Veilleux, 1985), como son: La distribución bimodal del tamaño de polen, la presencia de díadas y/o tríadas en el estadio de microspora y resultados inesperados de incremento en los niveles de ploidía en la progenie de cruces $4x \times 2x$ ó de $2x \times 4x$. El fenómeno de producir gametos no reducidos parece ser común en angiospermas

(Harlan y De Wet, 1985), pues es conocido en muchas de ellas y puede originar la aparición de series poliploides en la naturaleza (Veilleux, 1985).

La existencia de poliploides en la Serie Batatas también se podría explicar por la producción de polen $2n$. Parece ser que la producción de este tipo de polen es un fenómeno común en *I. trifida* e *I. batatas* (Becerra y Orjeda, 2002; Becerra, 1995; Jones, 1990; Orjeda *et al.*, 1990; Orjeda, 1990; Iwanaga *et al.*, 1990; Díaz e Iwanaga, 1989). Uno de los primeros trabajos en evidenciar la producción de polen $2n$ en *I. trifida* ($2n=2x=30$ cromosomas) fue el realizado por Orjeda *et al.* (1990), quienes encontraron que uno de los clones de *I. trifida* evaluados tenía distribución bimodal del diámetro de polen, la presencia de diádas y triadas en el estadio de microspora y una buena correlación entre éstas con el polen gigante y progenie tetraploide de cruces de diploides con tetraploides; lo que evidencia la producción de polen $2n$. Las mismas características fueron reportadas por Becerra y Orjeda (2002) en *I. batatas* tetraploide. Becerra (1995), Jones (1990), Orjeda *et al.* (1990) e Iwanaga *et al.* (1990) encontraron mónadas, diádas, tríadas, tétradas y políadas en observaciones meióticas. Becerra y Orjeda (2002) señalaron que la producción de diádas y tríadas se da por irregularidades en la meiosis y se presenta alta correlación con la producción de polen gigante. También se sabe que el polen $2n$ al presentar duplicado su genoma, es más grande en tamaño (Orrillo y Bornierbale, 2009, Becerra, 1995; Bohac, 1994; Jones, 1990). Por ello se podría estimar la producción de polen $2n$ a través de la producción de polen gigante. Camadro *et al.* (2008) estimó la producción de polen $2n$ en *Solanum okada* a través de la producción de polen gigante y Díaz e Iwanaga (1989) hicieron lo mismo para estimar la producción de polen $2n$ en especies *Ipomoea* pertenecientes a la Sección Batatas. En *I. trifida* y en *I. batatas* se puede considerar entonces como polen $2n$ aquellos granos que son un 30% más

grandes que el promedio de diámetro de polen normal (polen n) (Becerra y Orjeda, 2002; Orjeda, 1995; Orjeda *et al.*, 1990; Orjeda, 1990) aunque Díaz e Iwanaga (1989) consideraron como polen 2n aquel que sólo excedía solamente en un 20% al diámetro promedio de grano de polen n.

Los porcentajes de producción de polen gigante hallados estuvieron entre 0.04% y 2,37% en cada individuo, éstos fueron bajos, pero se encuentran cercanos a lo mencionado por Orjeda (1990), que encontró frecuencias entre 0.23% y 10.12% en San Ramón y entre 0.155% hasta 9.36% en La Molina. Se menciona que en otras especies también se presenta una frecuencia baja de producción de este tipo de gametos (Ramsey, 2007; Bretagnolle, 2001). Sin embargo, en *Ipomoea* han sido reportados porcentajes de producción de polen gigante mayores aún, Jones (1990) reportó en *I. batatas* tetraploide un máximo de 74% en un individuo, además de Becerra y Orjeda (2002) encontraron que la frecuencia varió entre 0.3% y 30% en la entrada 81.2 (*I. batatas* tetraploide)

El bajo porcentaje de producción de polen gigante encontrado en cada individuo podría haberse visto afectado por el ambiente. Orjeda (1990) encontró que los productores de polen gigante en un ambiente no necesariamente fueron los mismos en otro. Becerra (1995) encontró mayor producción de polen gigante que Jones (1990) en la misma entrada debido a que la evaluación se hizo en ambientes diferentes. Crespel *et al.* (2006) también mencionaron que el porcentaje de producción de polen gigante en *Rosa* puede variar debido a las condiciones ambientales. Se sabe entonces que el medio ambiente podría incrementar la producción de polen gigante y esto a su vez incrementar la posibilidad de cruces exitosos entre diferentes ploidías (Freyre, 1989), pudiendo así originarse series poliploides en la naturaleza.

En las entradas evaluadas, vale la pena mencionar que las entradas productoras de polen gigante presentan valores intermedios entre el diámetro promedio de polen y el valor de medida de polen gigante (Anexo 9.13). Pero en las entradas CIP 460379 y CIP 460380, ocurrió que éstas no presentaron dichos valores, solamente se encontró los valores de polen gigante (Anexo 9.13), es por ello que también fueron consideradas en la evaluación de diámetro de polen como entradas homogéneas, para hacer la comparación de diámetros de polen entre los diferentes niveles de ploidía.

La entrada CIP 460411, tuvo un individuo con el porcentaje más alto de producción de polen gigante (2.37%), por ello se le usó para graficar la distribución de frecuencias del diámetro de polen. Se encontró una clara distribución bimodal en dicho individuo (figura 6). Lo que nos indica que hay dos poblaciones de grano de polen y que puede tratarse de que una población es polen n y la otra polen $2n$ (Becerra y Orjeda, 2002; Becerra, 1995; Orjeda, 1990). Mientras que al hacer la distribución de frecuencias en la entrada CIP 460109, no productora de polen gigante, se encontró una distribución unimodal (figura 6), lo que nos indicaría que sólo hay una población de granos de polen. Podemos notar entonces que en *I. trifida* hay entradas que presentan individuos con dos poblaciones de grano de polen (productores de polen gigante), así como individuos que presentan una sola población de grano de polen (no productores de polen gigante). Al evaluar la entrada CIP 460411 en el estadio de microspora se observó la presencia de díadas y/o tríadas, con lo que se puede poner en evidencia la presencia de polen no reducido en la muestra, tal y como lo mencionaron: Becerra y Orjeda (2002), Becerra (1995) y Orjeda (1990), quienes encontraron alta correlación entre la producción de díadas y tríadas y la producción de polen gigante.

El origen de *I. batatas* (4x y 6x) puede estar relacionado con la producción de polen gigante (polen 2n), mediante autopoliploidía (Shiotani y Kawase, 1989; Shiotani y Kawase, 1987), siendo *I. trifida* 2x la especie que pudo haber dado origen a los niveles de ploidía superiores. Esto podría ser posible dado que Orjeda (1995), Orjeda *et al.* (1990) y Orjeda (1990) encontraron que el polen 2n puede ser viable. Orjeda *et al.* (1990), realizó cruces entre *I. trifida* diploide e *I. batatas* hexaploide obteniendo progenie con algunos individuos hexaploides y pentaploides, no sólo tetraploides como era lo esperado, lo que demuestra la funcionalidad del polen 2n. Así se ha demostrado la funcionalidad de este tipo de polen, y se ha logrado experimentalmente la poliploidización incrementando el nivel de ploidía (Freyre *et al.*, 1991; Orjeda *et al.*, 1991). La funcionalidad este tipo de polen también ha sido reconocida en triploides híbridos y estos a su vez podrían dar lugar a hexaploides (Kobayashi, 1984), sin embargo otros factores pueden verse implicados en la viabilidad de los cruces realizados para generar poliploides. Becerra y Orjeda (2002) mostraron que no se puede obtener progenie 6x de un cruce de 4x con 4x (2n) o de 4x con 8x (híbrido sintético) (Orjeda, 1995), lo que podría ser explicado por fallas en el desarrollo del endospermo (balance en el número de endospermo: EBN), siendo ésta una de las barreras de cruzabilidad a la hora de obtener híbridos en *Ipomoea* (Orjeda, 1995).

VII. CONCLUSIONES

1. Las 39 entradas de *Ipomoea trifida*, del Banco de Germoplasma de Centro Internacional de la Papa evaluadas, son diploides con $2n=2x=30$ cromosomas.
2. Se encontró buena correlación ($r=0.92$) entre el nivel de ploidía y el diámetro de grano de polen en 16 entradas evaluadas. Otras entradas presentan el diámetro de grano de polen es muy variable, lo cual no permite inferir el nivel de ploidía a través de dicha característica.
3. Algunas entradas en *Ipomoea trifida* presentan una distribución de frecuencias unimodal, de los diámetros de polen de sus individuos, indicando que hay una sola población de granos de polen. Mientras que otras presentan una distribución bimodal. Indicando que hay dos poblaciones de grano de polen: polen normal y polen gigante.
4. Pocas de las entradas de *Ipomoea trifida* evaluadas presentan producción de polen gigante (23%), y dentro de cada entrada sólo algunos individuos (entre 10% y 40%) presentan producción de dicho polen y la frecuencia de polen gigante por individuo es muy baja (entre 0.04% y 2,37%)

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTMANN, T., DAMM, B., FROMMER, W., MARTIN, T., MORRIS, P., SCHWEIZER, D., WILLMITZER, L. and SCHMIDT, R. Easy determination of ploidy level in *Arabidopsis thaliana* plants by means of pollen size measurement. *Plant Cell Rep.* 1994, vol. 13, p. 652 - 656.
- AUSTIN, D. F. Hybrid polyploids in *Ipomoea* section *Batatas* (Convolvulaceae). *J. Heredity.* 1977, vol. 68, p. 259-260.
- AUSTIN, D. The *Ipomoea batatas* complex Taxonomy. *Bull. Torrey Botanical Club.* 1978, vol. 105, n°2, p. 114–129.
- AUSTIN, D. Los camotes silvestres y cultivados del Perú, *Ipomoea* spp. (Convolvulaceae). *Boletín de Lima.* 1985, vol. 7, n° 41, p. 29-38.
- AUSTIN, D.F. The taxonomy, evolution and genetic diversity of sweet potatoes and related wild species. In: *Exploration, Maintenance and utilization of sweet potato genetic resources. First Planting Conference.* Lima, Perú,: International Potato Center. 1987. p. 27-59.
- AUSTIN, D., JANSSON, R. y WOLFE, G. Convolvulaceae and Cylas: A proposed hypothesis on the origins of this plant/insect relationship. *Tropical Agriculture* 1991, vol. 68, n° 2, p. 162-169.
- AUSTIN, D. and DE LA PUENTE, F. *Ipomoea tabascanana*, an endangered tropical species, *Economic Botany.* 1991, n° 45, vol. 3, p. 435.
- AUSTIN, D., JARRET, R. and De la Puente, F. Collecting tetraploid *Ipomoea batatas* (Linnaeus) Lamarck in Ecuador. *Plant Genetic Resources Newsletter.* 1993, vol. 91-92, p.33-35

- AUSTIN, D y HUAMAN, Z. A synopsis of *Ipomoea* (Convolvulaceae) in the Americas. Taxon. 1996, n° 45, p. 3-38.
- BECERRA LOPEZ-LAVALLE, Augusto. Determinación del mecanismo de producción de polen 2n en dos especies de *Ipomoea*, *Ipomoea batatas* (4x) e *Ipomoea triloba* (2x). Tesis M.Sc. Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH), Lima, 1995.
- BECERRA LOPEZ-LAVALLE, L and ORJEDA, G. Occurrence and Cytological Mechanism of 2n Pollen Formation in a Tetraploid Accession of *Ipomoea batatas* (Sweet Potato). Journal of Heredity. 2002, vol. 93, p. 185-192.
- BOHAC, J., JONES, A. and AUSTIN, D. Unreduced pollen: proposed mechanism of polyploidization of sweet potato (*Ipomoea batatas*). HortScience. 1992. vol. 27, p. 611.
- BOHAC, J., AUSTIN, D. and JONES, A. Discovery of wild tetraploid sweet potatoes. Economic Botany. 1993, vol. 47, n° 2, p.193-201.
- BOHAC, J and JONES, A. Unreduced pollen in hexaploid sweet potato (*Ipomoea batatas*). The Journal of Heredity. 1994, vol. 85, n° 2, p.162-166.
- BOHAC, J. Quantization of DNA of propidium iodide-stained nuclei from *Ipomoea* species and sweet potato using DNA flow cytometry. HortScience. 1996, vol. 31, n° 4, p. 612.
- BRETAGNOLLE, F. Pollen production and spontaneous polyploidization in diploid populations of *Anthoxanthum alpinum*. Biological Journal of the Linnaean Society. 2001, vol. 72, p. 241–247.

- CAMADRO E., SAFFARANO, Sandra., ESPINILLO, Juan., CASTRO, M. and SIMON, P. Cytological mechanisms of $2n$ pollen formation in the wild potato *Solanum okadae* and pollen-pistil relations with the cultivated potato, *Solanum tuberosum*. Genetic Resources and Crop Evolution. 2008, vol. 55, n° 3, p. 471-477.
- CRESPER, L., RICCI, S. and GUDIN, S. The production of $2n$ pollen in *Rose*. Euphytica. 2006, vol. 151, p.155-164.
- CRONQUIST, Arthur. *An integrated system of classification of flowering plants*. New York: Columbia University Press. 1981.
- CRONQUIST, Arthur. *The Evolution y Classification of Flowering Plants*. Second Edition. The New York Botanical Garden, New York. 1988.
- DEWITTE, A., LEUS, L., EECKHAUT, T., VANSTECHELMAN, I., HUYLENBROECK, J. and BOCKSTAELE, E. Genome size variation in *Begonia*. Genome. 2009, vol. 52, p. 829-838.
- DIAZ, J., MONT, J. and IWANAGA, M. $2n$ pollen frequency and relation between pollen diameter with ploidy level in 8 species, genera *Ipomoea*, Sect. Batatas. ALAG SPG. IX Congreso latinoamericano de genética. II Congreso peruano de genética: Libro de resúmenes. Lima (Perú). ALAG; SPG. 1989. p. 124.
- FREYRE SALA, Rossana. Producción de hexaploides sintéticos de *Ipomoea trifida* (H.B.K.) G. Don. Tesis Título Profesional. Universidad Nacional Agraria La Molina. Facultad de Ciencias. Departamento Académico de Biología, Lima, Perú. 1989.

- FREYRE, R., IWANAGA, M. and ORJEDA, G. Use of *Ipomoea trifida* (HBK) G. Don germplasm for sweet potato improvement. 2: Fertility of synthetic hexaploids and triploids with 2n gametes of *I. trifida*, and their interspecific crossability with sweet potato. *Genome*. 1991, vol. 34, p. 209-214.
- HAMBALI, G. Tuberization in diploid *Ipomoea trifida* from Citatah, West Java, Indonesia. *Proc. the Eighth Symposium of the International Society for Tropical Root Crops*. 1988, p. 469-473.
- HARLAN, J. and DE WET, J. On Ö. Winge and a prayer: the origins of polyploidy. *Bot. Rev.* 1985, vol 41, p. 361-390.
- HRISHI, N. and VIJAYA, K.. Cytology of diploid and triploid *Ipomoea obscura* (L.) Ker-Gawl. *Journal of Root Crops*. 1977, vol. 3, n° 1, p. 13-16.
- HU, Jingjie., NAKATANI, Makoto., LALUSIN, Antonio., KURANOUCI, Toshikazu and FUJIMURA, Tatsuhito. Genetic analysis of sweet potato and wild relatives using inter-simple sequence repeats (ISSRs). *Breed Science*. 2003, vol. 53, p. 297-304.
- HUAMAN, Zosimo. Botany, origin, evolution and biodiversity of the sweet potato. In: Huaman Z (eds) *Sweet potato Germplasm Management Training Manual*. International Potato Center, Lima Peru. 1999.
- HUANG, J.C. and SUN, M. Genetic diversity and relationships of sweet potato and its wild relatives in *Ipomoea* series Batatas (Convolvulaceae) as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) and restriction analysis of chloroplast DNA. *Theoretical and Applied Genetics*. 2000. vol. 100, n° 7, p. 1050-1060.

- HUANG, J., CORKE , H. and SUN, M. Highly polymorphic AFLP markers as a complementary tool to ITS sequences in assessing genetic diversity and phylogenetic relationships of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) and its wild relatives. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 2002, vol. 49, n° 6, p. 541-550.
- IWANAGA M., YOON, N. and UMEMURA, Y. Evaluation of the breeding value of 5x interspecific hybrids between sweet potato cultivars and 4x *Ipomoea trifida*. Mackay, K.T.Palomar, M.K.Sanico, R.T. (eds.). *Sweet potato research and development for small farmers*. Laguna. 1989, p. 57-65.
- IWANAGA, M., FREYRE, R. and ORJEDA, G. Use of *Ipomoea trifida* (HBK) G. Don germplasm for sweet potato improvement. 1: Development of synthetic hexaploids of *I. trifida* by ploidy-level manipulations. *Genome*. 1991, vol. 34, p. 201-208
- JARRET, R., GAWEL, N. and WHITTEMORE, A. Phylogenetic relationships of the sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.]. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 1992, vol. 117, n° 4, p. 633-637.
- JARRET, R. L. and AUSTIN, D. F. Genetic diversity and systematic relationships in sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) and related species as revealed by RAPD analysis. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 1994, vol. 41, p. 165-173.
- JONES, A. Chromosome numbers in the genus *Ipomoea*. *Journal of Heredity*. 1964, vol. 55, n° 5, p. 216-219.
- JONES, A. Should Nishiyama's K123 (*Ipomoea trifida*) be designated *I. batatas*?. *Econ. Bot.* 1967, vol. 21, p. 163-166.

- JONES, A. Chromosome numbers in *Ipomoea* and related genera. Journal of Heredity. 1968, vol. 59, n° 2, p. 99-102.
- JONES, A. Asynapsis in *Ipomoea gracilis*. Journal of Heredity. 1970, vol. 61, p. 151-52.
- JONES, A. Unreduced pollen in wild tetraploid relative of sweet potato. Journal of the American Society for Horticultural Science. 1990, vol. 115, p. 512
- JONES, K., REED, S. and RINEHART, T. Analysis of ploidy level and its effects on guard cell length, pollen diameter and fertility in *Hydrangea macrophylla*. HortScience. 2007, vol. 42, n° 3, p. 483-488.
- KATSIOTIS, A. and FORSBERG, R. Pollen grain size in four ploidy levels of genus *Avena*. Euphytica. 1995, vol. 83, p.103-108
- KING, J. and BAMFORD, R. The chromosome number in *Ipomoea* and related genera. Journal of Heredity. 1937, vol. 28, p. 279-282.
- KLUG M., Cummings, M. and Spencer, C. Conceptos de Genética. 8^{ava} edición. Prentice Hall. Autorizado por Pearson Educación S.A.. 2006.
- KOBAYASHI, M. The *Ipomoea trifida* complex closely related to sweet potato. Proceedings of a symposium of the International Society of Tropical Root Crops. Edited by S.F Shideler and H. Rincon. International Potato Center. Lima, Perú. 1984, p. 561-568.
- KOWYAMA, Y., SHIMANO, N. and KAWASE, T. Genetic analysis of incompatibility in the diploid *Ipomoea* species closely related to the sweet potato. Theoretical and Applied Genetics. . 1980, vol. 58, p. 149–155.

- KOWYAMA, Y., TSUCHIYA, T. and KAKEDA, K. Sporophytic self-incompatibility in *Ipomoea trifida*, a close relative of sweet potato. *Annals of Botany*. 2000, vol. 85 (Suppl), p. 191–196.
- MAGOON, M., KRISHNAN, R., and VIJAYA, K. Cytological evidence on the origin of sweet potato. *Theoretical and applied Genetics*. 1970, vol. 40, p. 360-366.
- MARS, G. An aceto-carmin glycerol jelly for use in pollen-fertility counts. *Stain Technology*. 1954, vol. 29, n° 5, p. 277.
- MARTIN, F. and JONES, A. The Species of *Ipomoea* Closely Related to the Sweet Potato. *Economic Botany*. 1972, vol. 26, n°3, p. 201-215
- MCDONALD, J. and AUSTIN, D. Changes and additions in *Ipomoea* section Batatas (convolvulaceae). *Brittonia*. 1990, vol. 42, n° 2, p. 116-120.
- MÉNDEZ Jiménez, M. Determinación de la ploidía del Ulluco (*Ullucus tuberosus* Caldas. Tesis título profesional Ingeniero Agrónomo. Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM). Facultad de Agronomía. Lima (Perú). 1995.
- NAKAJIMA, G. Karyotype of genus *Ipomoea*. *Cytology*. 1963, vol. 28, p. 351–359
- NISHIYAMA, I. Collecting the sweet potato and its allied species in U.S.A. and Mexico. *Japanese Journal of Breeding*. 1959, vol. 9, p. 73-8.
- NISHIYAMA, I. and TERAMURA, T. Mexican wild form of sweet potato. *Economic Botany*. 1962, vol. 16, p. 304-314.
- NISHIYAMA, I. The origin of the sweet potato plant. In : Barrau J. (ed.) *Plants and the migrations of Pacific peoples*. Bishop Mus. Press. Honolulu. 1963, p. 119-128.

- NISHIYAMA, I. Evolution and Domestication of the Sweet-Potato. Botanical Magazin. 1971, vol. 84, p. 377-87.
- NISHIYAMA, I. Evolutionary autopoloidy in the Sweet Potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) and its progenitors. Euphytica. 1975, vol.24, p. 197-208.
- NISHIYAMA, I., MIYAZAKI, T. and SAKAMOTO, S. Evolutionary autopoloidy in the sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) and its progenitors. Euphytica. 1975, vol. 24, no 1, p. 197-208.
- PELOQUIN, S., BOITEAUX, L. and CARPUTO, D. Meiotic mutants in potato: valuable variants. Genetics. 1999, vol. 153, p. 1493–1499.
- OGUNWENMO, K. Cytology and hybridization in *Ipomoea triloba* L. complex (Convolvulaceae) and its taxonomic consequences. Acta Satech. 2005, vol. 2, nº1, p. 19-23.
- ORACION, M., NIWA, K. and SHIOTANI, I. Cytological analysis of tetraploid hybrids between sweet potato and diploid *Ipomoea trifida* (H.B.K.). Don. Theoretical and Applied Genetics. 1989, vol. 80, nº 5, p. 617-624.
- ORACION, M., NIWA, K. and SHIOTANI I. Cytological analysis of tetraploid hybrids between sweet potato and diploid *Ipomoea trifida* (H.B.K.). Don. Theoretical and Applied Genetics. . 1990, vol. 80, nº 5, p. 617-624.
- ORACION, M. Determination and analysis of somatic chromosome numbers in sweet potato cultivars, related *Ipomoea* species, and interspecific hybrids. Annals of Tropical Research. 1995, vol. 17, nº 1, p. 11-23.
- ORJEDA, G. Desarrollo y uso de híbridos interespecíficos entre *Ipomoea batatas* Lam. ($2n=6x=90$) e *Ipomoea Trifida* (H.B.K.) G. Don ($2n=2x=30$) como

- probadores de especies silvestres diploides y tetraploides. Tesis M.Sc. Universidad Nacional Agraria La Molina. Facultad de Ciencias, Lima, Perú. 1990.
- ORJEDA, G; FREYRE, R and IWANAGA, M. Production of 2n pollen in diploid *Ipomoea trifida*, a putative wild ancestor of sweet potato. Journal of Heredity. 1990, vol 81,p. 462-467.
- ORJEDA, G., FREYRE, R. and IWANAGA, M. Use of *Ipomoea trifida* germplasm for Sweet potato improvement. 3: Development of 4x interspecific hybrids between *Ipomoea batatas* (L.) Lam. ($2n=6x=90$) and 1. *trifida* (H.B.K) G. Don. ($2n=2x=30$) as storage-root initiators for wild species. Theoretical and Applied Genetics. . 1991, vol. 83, n° 2, p. 159-163.
- ORJEDA, Gisela. Ploidy manipulations for sweet potato breeding and genetic studies (CIP). Thesis Ph.D. University of Birmingham. Faculty of Science. (UK).. Birmingham, 1995.
- ORRILLO M. and BONIERBALE, M. Biología reproductiva y citogenética de la papa – Manual técnico. Centro Internacional de la Papa (CIP). 2009.
- ORTIZ, R. Occurrence and inheritance of 2n pollen in Musa. Annals of Botany.1997, vol. 79, p. 449-453.
- OZIAS-AKINS, P. and JARRET, R. Nuclear DNA content and ploidy levels in the genus *Ipomoea*. Journal of the American Society for Horticultural Science. 1994, vol. 119, p. 110-115.
- PANIAGUA, R. Biología celular. 3 edición. McGraw-Hill Interamericana de España, S.A.U. 2007.

- RAHMAN, M., TSUCHIYA, T., SUWABE, K., KOHORI, J., TOMITA, R., KAGAYA, Y., KOBAYASHI, Y., KAKEDA, K. and KOWYAMA, Y. Physical size of the S locus region defined by genetic recombination and genome sequencing in *Ipomoea trifida*, Convolvulaceae. Sexual Plant Reproduction. 2007, vol. 20, p. 63–72.
- RAJAPAKSE, S; NILMALGODA, S; MOLNAR, M; BALLARD, R; AUSTIN, D and BOHAC, J. Phylogenetic relationships of the sweet potato in *Ipomoea* series batatas (Convolvulaceae) based on nuclear β -amylase gene sequences. Molecular Phylogenetics and Evolution. 2004, vol. 30, n° 3, p. 623-632.
- RAMSEY, J. Unreduced gametes and neopolyploids in natural populations of *Achillea borealis* (Asteraceae). Heredity. 2007, vol. 98, p. 143-150.
- SHARMA, A. and SHARMA, A. Chromosome techniques: Theory and practice. Third edition. London (UK). Butterworths . 1980.
- SHARMA, A. and SHARMA, A. Chromosome Techniques. Theory and Practice. Third edition. University Park Press Baltimore and Butterworths London. England. 1991.
- SHIOTANI, I. and KAWASE, T. Synthetic Hexaploids Derived from Wild Species Related to Sweet Potato. The Japanese Society of Breeding. 1987, vol. 37, p. 367-376.
- SHIOTANI, I. and KAWASE, T. Genomic structure of the sweet potato and hexaploids in *Ipomoea trifida* (H.B.K.) DON. Japanese Journal of Breeding. 1989, vol. 39, n° 1, p. 57-66.
- SHIOTANI, I., HUANG, Z., SAKAMOTO, S. and MIYASAKI, T. The role of the wild *Ipomoea trifida* germplasm in sweet potato breeding. Ofori, F.Hahn, S.K. (eds.).

- Tropical root crops in a developing economy. Wageningen. International Society for Tropical Root Crops. 1994, vol. 4, p. 388-398.
- STANLEY, R and LINSKENS, H. Pollen: Biology, biochemistry, management. Chapter 3. Dehiscence, size and distribution. 1974, p. 24-36
- SRISUWAN, S., SIHACHAKR, D., SILJAK-YAKOVLEV, S. The origin and evolution of sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam.) and its wild relatives through the cytogenetic approaches. Plant Science. 2006, vol. 171, n° 3, p. 424-33.
- TERAMURA T. Phylogenetic study of *Ipomoea* species in the section Batatas. Memoirs of the College Agriculture, Kyoto University 1979, vol. 114, p. 29-48.
- TING, Y., KEHR, A. and MILLER, J. A Cytological Study of the Sweet Potato Plant *Ipomoea batatas* (L.) Lam. and its Related Species. The American Naturalist. 1957, vol. 91, n° 858, p. 197-203.
- UGENT, D. y OCHOA, C. La *Etnobotánica del Perú desde la prehistoria al presente*. Centro de producción empresarial de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 2006.
- VALLADOLID CAVERO, A. Niveles de ploidía de la oca (*Oxalis tuberosa* Mol.) y sus parientes silvestres. Tesis M.Sc. Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM), Lima, 1996.
- VALLADOLID, A., Blas, R. y Gonzáles, R. Introducción al recuento de cromosomas somáticos en raíces andinas. Seminario, J. (ed.). Raíces andinas: Contribuciones al conocimiento y a la capacitación. Universidad Nacional de Cajamarca; CIP; Agencia Suiza para el Desarrollo y la Cooperación. Conservación y Uso de la Biodiversidad de Raíces y Tubérculos Andinos: Una década de investigación para el Desarrollo. Lima (Peru). 2004, no. 6 : 95-99.

- VEILLEUX, R. Diploid and polyploid gametes in crop plants: mechanisms of formation and utilization in plant breeding. *Plant Breeding Reviews*. 1985, vol. 3, p. 253-288.
- WANG, C., ZHANG, L., DAI, S., ZHENG, Y., ZHANG, H. and LIU, D. Formation of unreduced gametes is impeded by homologous chromosome pairing in tetraploid *Triticum turgidum* x *Aegilops tauschii* hybrids. *Euphytica*. 2010, vol. 175, p. 323–329
- WATANABE, K. and PELOQUIN, S. Occurrence and frequency of 2n pollen in 2x, 4x and 6x wild tuber-bearing *Solanum* species from Mexico and Central and South Americas. *Theoretical and Applied Genetics*. 1991, vol. 82, p. 621-626.
- YEN, D., GAFFEY, P. and COATES, D. Chromosome numbers of Australian species of *Ipomoea* (Convolvulaceae). *Austrabaileya*. 1992, vol. 3, no 4, p. 749-755

IX. ANEXOS

Anexo 9.1. Datos de las 39 entradas evaluadas de *I. trifida* del Banco de Germoplasma del Centro Internacional de la Papa.

Número CIP	LOTID	Número de Colector	País de origen	Subdivisión Administrativa 1	Subdivisión Administrativa 4	Elevación (msnm)	Latitud	Longitud	Tipo Cruza
CIP 460097	3381	DLP 874	Venezuela	Magdalena	20 Km. E Barranquilla-sta.marta	600	10.33	-67.66	Original
CIP 460099	4385	DLP 1050	Colombia	Magdalena	15 Km. S Rodadero-Cienaga	110	9.50	-75.16	Original
CIP 460109	7030	DLP 2994	Colombia	Magdalena	25 Km. S Cienaga-fundación	5	10.93	-74.66	Original
CIP 460110	7032	DLP 2996	Colombia	Escuintla	15 Km. NE Escuintla-siquinala	20	11.13	-74.25	Original
CIP 460111	7036	DLP 2997	Colombia	Guatemala	0.1 Km. N Entrada A Amatitlan	20	10.83	-74.13	Original
CIP 460187	9239	DLP 3689	Guatemala	Chiapas	40km S Tuxtla Gtrez-villaflore	218	14.36	-90.91	Original
CIP 460226	9223	DLP 3678	Guatemala	Guatemala	0.1 Km. N Entrada A Amatitlan	1800	14.48	-90.66	Original
CIP 460229	-	DLP 4346	México	Chiapas	40km S Tuxtla Gtrez-villaflore	800	16.50	-93.16	-
CIP 460231	-	DLP 4357	México	Oaxaca	3km Nw Pinotepa Nac-acapulco	140	16.35	-98.26	-
CIP 460232	-	DLP 4364	México	Guerrero	10km Nw Poluta-zorcua	5	17.93	-101.80	-
CIP 460236	-	DLP 4373	México	Michoacan	5km NE Arteaga-Uruapan	720	18.33	-102.26	-
CIP 460239	-	DLP 4401	México	Veracruz	Los Conejos	840	19.03	-97.08	-
CIP 460262	9279	DLP 3766	Guatemala	Veracruz	Los Conejos	1180	14.31	-90.43	Original
CIP 460371	8450	DLP 4588	Nicaragua	Granada	Toyguay	110	11.88	-85.95	Autopolinización
CIP 460379	8471	DLP 4599	Nicaragua	Managua	Villa Los Brasiles Vía León	80	11.96	-85.56	Original
CIP 460380	8474	DLP 4600	Nicaragua	León	Granero De Enabas Vía Sta. Rita	80	11.96	-85.56	Original
CIP 460384	8492	DLP 4605	Nicaragua	Managua	Villa Los Brasiles Vía León	120	12.30	-86.36	Original
CIP 460386	8494	DLP 4607	Nicaragua	León	Km. 46 Managua-león	120	12.26	-86.66	Original
CIP 460387	8497	DLP 4608	Nicaragua	Esteli	Los Mojones-centeno	120	12.36	-86.66	Original
CIP 460388	8500	DLP 4609	Nicaragua	Matagalpa	Agua Sarca	100	12.81	-86.58	Original
CIP 460390	8506	DLP 4616	Nicaragua	Boaca	Km. 9 Tierra Azul-camoapa	560	13.35	-86.43	Original
CIP 460403	8553	DLP 4646	Nicaragua	Boaca	Sacal	360	12.76	-85.40	Original

Anexo 9.1. Continuación.

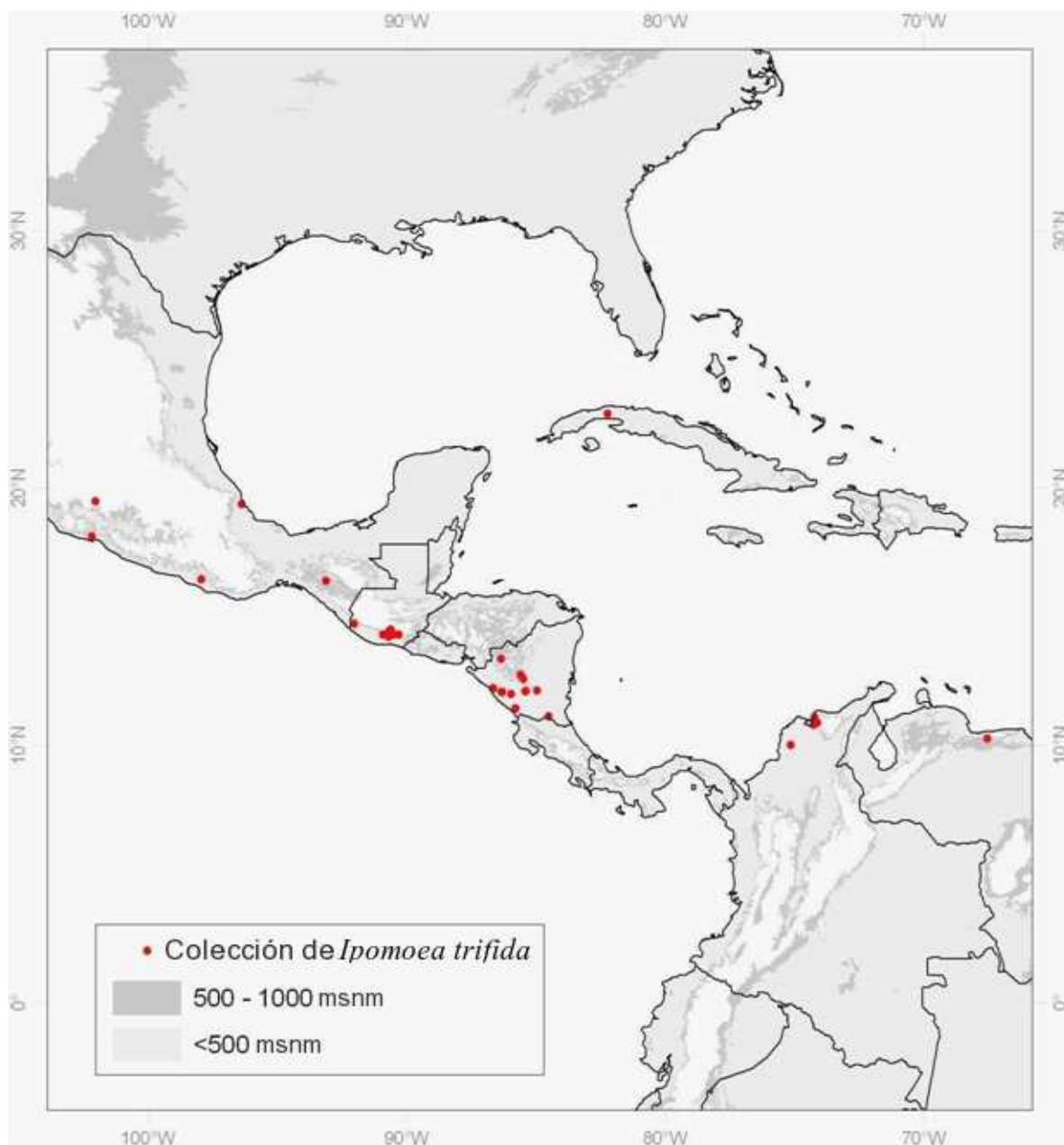
Número CIP	LOTID	Número de Colector	País de origen	Subdivisión Administrativa 1	Subdivisión Administrativa 4	Elevación (msnm)	Latitud	Longitud	Tipo Cruza
CIP 460406	8561	DLP 4649	Nicaragua	Chontales	Km. 8 Juigalpa-Sto. Tomas	300	12.65	-85.76	Original
CIP 460407	8563	DLP 4650	Nicaragua	Chontales	Km. 30 Juigalpa-sto Tomas	360	12.53	-85.76	Original
CIP 460408	8565	DLP 4651	Nicaragua	Chontales	Km. 36 Juigalpa-sto Tomas	120	12.08	-85.33	Original
CIP 460410	8568	DLP 4653	Nicaragua	Chontales	Salida Sto Tomas-villa Sandino	140	12.01	-85.16	Original
CIP 460411	8571	DLP 4654	Nicaragua	Rio San Juan	La Paila	420	12.03	-85.16	Original
CIP 460412	8578	DLP 4655	Nicaragua	Managua	Villa Panamá	420	12.03	-85.11	Autopolinización
CIP 460424	8603	DLP 4673	Nicaragua	Managua	Barrio Santa Ana	80	11.61	-84.83	Original
CIP 460429	8616	DLP 4691	Nicaragua	Managua	Barrio Santa Ana	200	12.15	-86.26	Original
CIP 460431	8622	DLP 4693	Nicaragua	Managua	Entrada Carnic	100	12.15	-86.26	Original
CIP 460432	8074	DLP 4694	Nicaragua	Managua	Villa Las Colinas	120	12.15	-86.26	Original
CIP 460435	8082	DLP 4698	Nicaragua	La Habana	Plaza De La Revolución	80	12.15	-86.26	Original
CIP 460438	8091	DLP 4701	Nicaragua	Managua	Villa Las Colinas	220	12.15	-86.26	Original
CIP 460551	10010	DLP 5395	Cuba	La Habana	Plaza De La Revolución	5	23	-82.5	Original
CIP 460736	9262	DLP 3721	Guatemala	San Marcos	3 Km. Se Pajapita-San Marcos	120	14.66	-92.16	Original
CIP 460741	9265	DLP 3730	Guatemala	Escuintla	10 Km. NW Masagua-cuyuta	100	14.3	-90.96	Original
CIP 460745	9267	DLP 3734	Guatemala	Escuintla	15 Km. Se Escuintla-brito	220	14.25	-90.7	Original
CIP 460763	9276	DLP 3760	Guatemala	Santa Rosa	0.5 Km. Se Cuilapa-chuqui	690	14.21	-90.33	Original

LOTID: Código de sobre de semillas que corresponde a una entrada

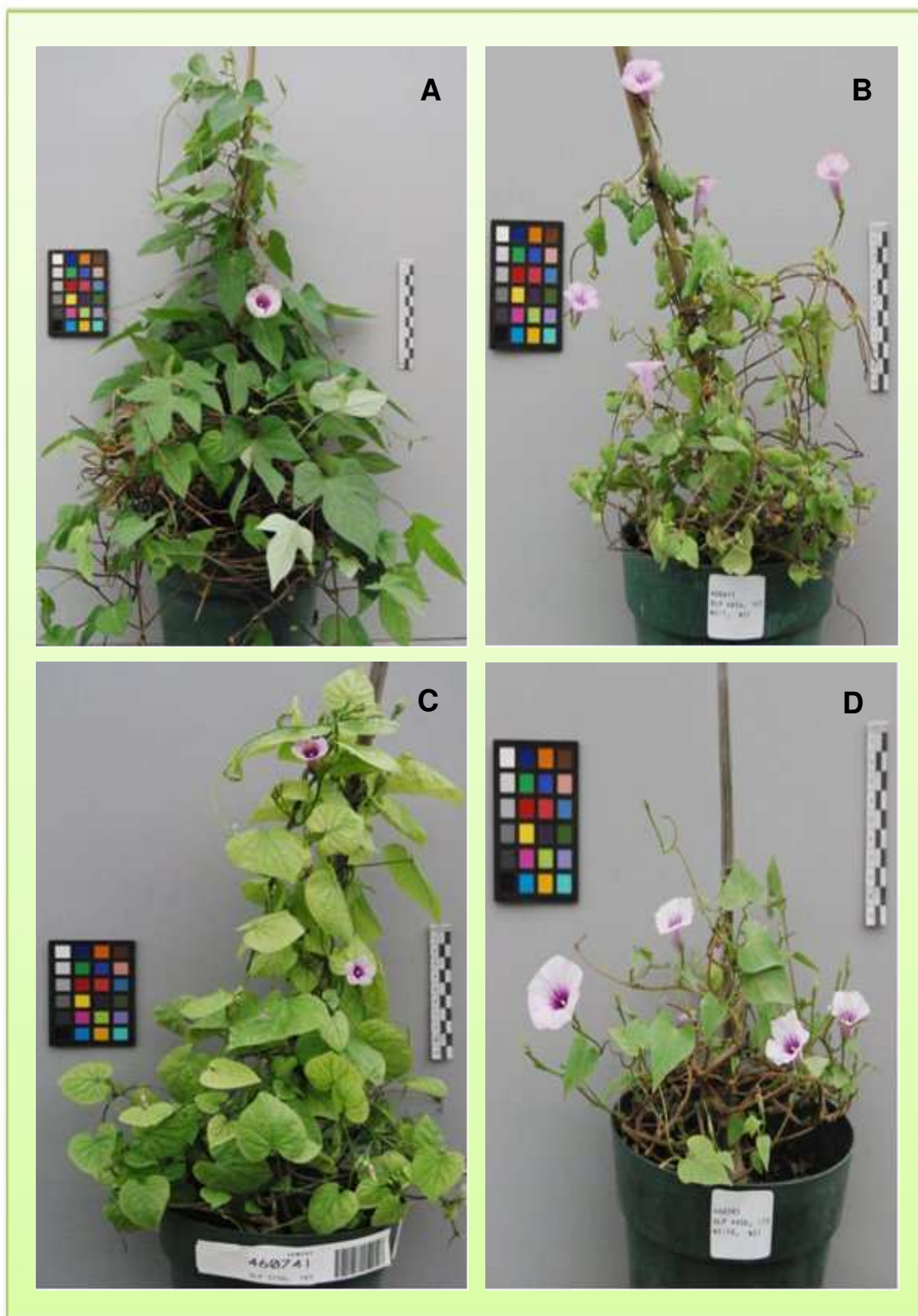
Número de Colector: Código asignado al ser colectado el material.

Subdivisión Administrativa 1 Y 4: ubicación política donde se colectó la entrada

Tipo de Cruza: Indica el origen de la semillas de cada entrada. Se muestra con guión las entradas proporcionadas por el USDA



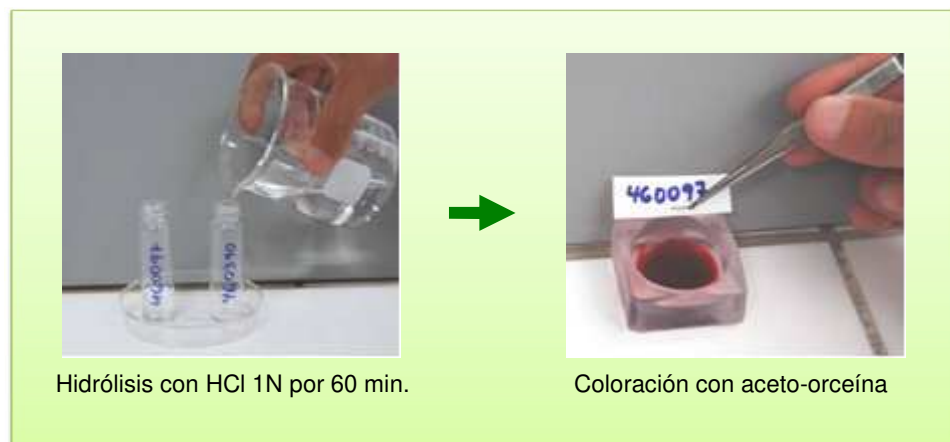
Anexo 9.2. Mapa de distribución de las entradas de *Ipomoea trifida* evaluadas. Los puntos rojos indican los lugares de procedencia de las semillas.



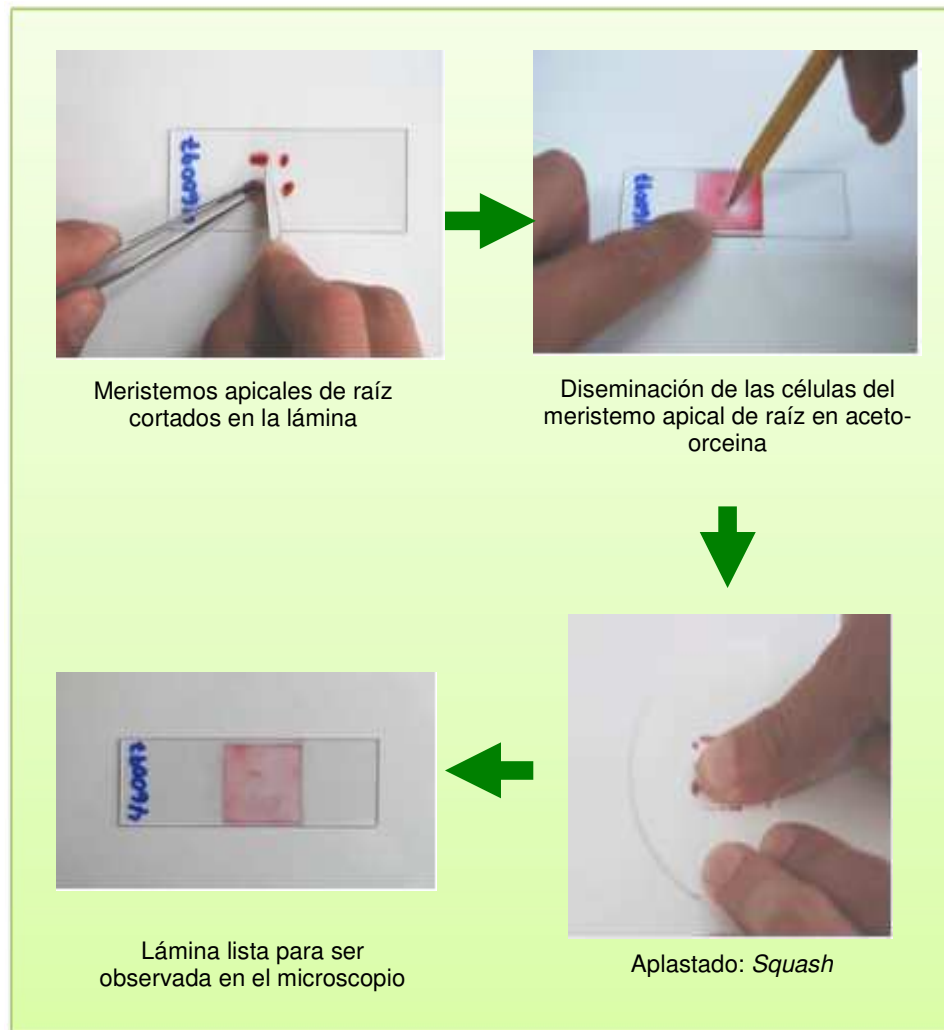
Anexo 9.3. Vista de algunas de las entradas evaluadas. **(A)** entrada CIP 430434 ($2n=4x=60$). **(B)** entrada CIP 460411 ($2n=2x=30$). **(C)** entrada CIP 460741 ($2n=2x=30$). **(D)** entrada CIP 460385 ($2n=2x=30$).



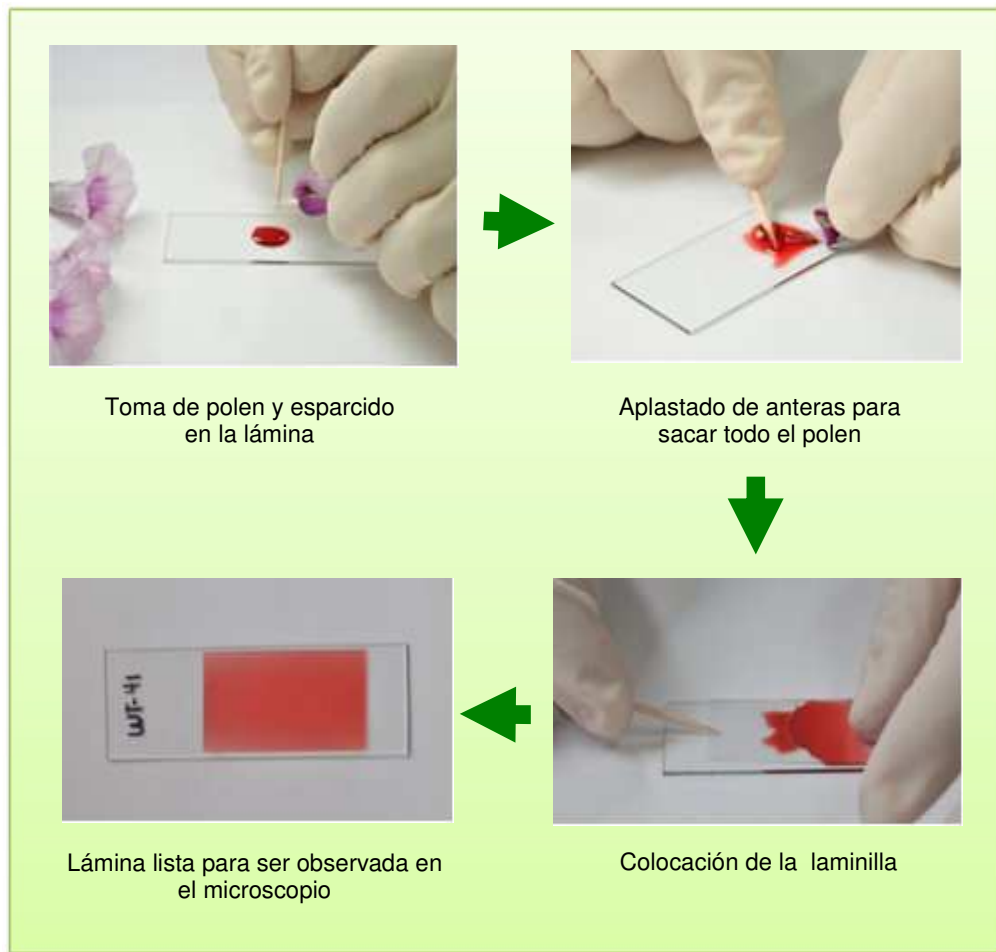
Anexo 9.4. Recolección de raíces para el pretratamiento de la muestra



Anexo 9.5. Preparación de los meristemos apicales de raíz.



Anexo 9.6. Secuencia de preparación de las muestras de meristemos apicales de raíz para el conteo de cromosomas



Anexo 9.7. Secuencia de preparación de las muestras para evaluar la viabilidad, polen $2n$ y diámetro de polen

Anexo 9.8. Porcentaje de viabilidad de las entradas evaluadas

Entrada	Nº individuo	Polen Viable	Polen no viable	Porcentaje viable	Porcentaje no viable
CIP 430406	1	190	18	91.35	8.65
	2	208	5	97.65	2.35
	3	203	34	85.65	14.35
	4	160	58	73.39	26.61
CIP 430434	1	212	18	92.17	7.83
	2	193	8	96.02	3.98
	3	201	10	95.26	4.74
	4	203	8	96.21	3.79
	5	205	6	97.16	2.84
CIP 460097	1	177	51	77.63	22.37
	2	217	5	97.75	2.25
	3	202	0	100.00	0.00
	4	206	0	100.00	0.00
CIP 460099	1	195	17	91.98	8.02
	2	237	55	81.16	18.84
	3	204	3	98.55	1.45
	4	180	37	82.95	17.05
	5	203	5	97.60	2.40
CIP 460109	1	205	4	98.09	1.91
	2	203	14	93.55	6.45
	3	202	4	98.06	1.94
	4	205	7	96.70	3.30
	5	208	8	96.30	3.70
CIP 460110	1	200	2	99.01	0.99
	2	261	261	50.00	50.00
	3	201	3	98.53	1.47
	4	204	4	98.08	1.92
CIP 460187	1	180	54	76.92	23.08
	2	194	24	88.99	11.01
	3	206	5	97.63	2.37
CIP 460232	1	180	26	87.38	12.62
	2	208	208	50.00	50.00
	3	192	12	94.12	5.88
CIP 460262	1	165	88	65.22	34.78
	2	201	16	92.63	7.37
	3	213	31	87.30	12.70
	4	201	3	98.53	1.47
	5	195	20	90.70	9.30
CIP 460375	1	182	43	80.89	19.11
	2	211	5	97.69	2.31
	3	204	30	87.18	12.82
	4	200	3	98.52	1.48
	5	181	181	50.00	50.00

Anexo 9.8. Continuación.

Entrada	Nº individuo	Polen Viable	Polen no viable	Porcentaje viable	Porcentaje no viable
CIP 460379	1	203	10	95.31	4.69
	2	198	6	97.06	2.94
	3	211	5	97.69	2.31
	4	208	4	98.11	1.89
	5	181	24	88.29	11.71
	6	185	21	89.81	10.19
CIP 460380	1	207	3	98.57	1.43
	2	200	2	99.01	0.99
	3	205	13	94.04	5.96
	4	326	326	50.00	50.00
	5	214	11	95.11	4.89
	6	170	43	79.81	20.19
	7	213	6	97.26	2.74
CIP 460385	1	203	9	95.75	4.25
	2	205	2	99.03	0.97
	3	220	9	96.07	3.93
	4	204	3	98.55	1.45
	5	204	5	97.61	2.39
	6	200	4	98.04	1.96
	7	202	6	97.12	2.88
CIP 460386	1	200	6	97.09	2.91
	2	323	17	95.00	5.00
	3	219	5	97.77	2.23
	4	224	13	94.51	5.49
	5	198	2	99.00	1.00
	6	202	8	96.19	3.81
	7	202	7	96.65	3.35
	8	195	11	94.66	5.34
CIP 460387	1	210	9	95.89	4.11
	2	206	18	91.96	8.04
	3	204	10	95.33	4.67
	4	198	9	95.65	4.35
	5	194	67	74.33	25.67
	6	214	7	96.83	3.17
CIP 460388	1	200	10	95.24	4.76
	2	219	11	95.22	4.78
	3	194	9	95.57	4.43
	4	212	3	98.60	1.40
	5	201	11	94.81	5.19
	6	200	18	91.74	8.26
CIP 460390	1	199	4	98.03	1.97
	2	201	0	100.00	0.00
	3	213	2	99.07	0.93
	4	212	9	95.93	4.07
	5	205	5	97.62	2.38

Anexo 9.8. Continuación.

Entrada	Nº individuo	Polen Viable	Polen no viable	Porcentaje viable	Porcentaje no viable
CIP 460403	1	198	5	97.54	2.46
	2	210	4	98.13	1.87
	3	202	1	99.51	0.49
	4	200	28	87.72	12.28
CIP 460406	1	263	14	94.95	5.05
	2	25	0	100.00	0.00
	3	201	0	100.00	0.00
	4	200	2	99.01	0.99
CIP 460407	1	205	8	96.24	3.76
	2	233	14	94.33	5.67
	3	204	5	97.61	2.39
	4	623	0	100.00	0.00
CIP 460408	1	198	37	84.26	15.74
	2	126	0	100.00	0.00
	3	193	10	95.07	4.93
	4	203	0	100.00	0.00
	5	210	0	100.00	0.00
	6	204	5	97.61	2.39
	7	210	7	96.77	3.23
	8	206	5	97.63	2.37
	9	197	20	90.78	9.22
	10	201	22	90.13	9.87
CIP 460410	1	201	7	96.63	3.37
	2	189	25	88.32	11.68
	3	201	23	89.73	10.27
CIP 460411	1	207	6	97.18	2.82
	2	64	41	60.95	39.05
	3	202	17	92.24	7.76
	4	227	2	99.13	0.87
	5	221	16	93.25	6.75
	6	213	10	95.52	4.48
	7	213	10	95.52	4.48
CIP 460424	1	211	3	98.60	1.40
	2	200	7	96.62	3.38
	3	197	27	87.95	12.05
	4	202	6	97.12	2.88
CIP 460429	1	230	9	96.23	3.77
	2	191	17	91.83	8.17
	3	201	2	99.01	0.99
	4	197	9	95.63	4.37
	5	202	22	90.18	9.82
	6	194	18	91.51	8.49

Anexo 9.8. Continuación.

Entrada	Nº individuo	Polen Viable	Polen no viable	Porcentaje viable	Porcentaje no viable
CIP 460431	1	203	4	98.07	1.93
	2	204	0	100.00	0.00
	3	209	0	100.00	0.00
	4	201	1	99.50	0.50
	5	209	3	98.58	1.42
	6	4	0	100.00	0.00
	7	206	0	100.00	0.00
CIP 460432	1	210	22	90.52	9.48
	2	205	0	100.00	0.00
	3	206	1	99.52	0.48
	4	206	9	95.81	4.19
	5	208	0	100.00	0.00
	6	204	0	100.00	0.00
CIP 460438	1	195	0	100.00	0.00
	2	200	4	98.04	1.96
	3	203	0	100.00	0.00
	4	210	10	95.45	4.55
CIP 460551	1	102	100	50.50	49.50
	2	214	0	100.00	0.00
	3	201	1	99.50	0.50
	4	205	0	100.00	0.00
	5	202	0	100.00	0.00
	6	195	0	100.00	0.00
CIP 460736	1	199	4	98.03	1.97
	2	209	5	97.66	2.34
	3	201	4	98.05	1.95
	4	205	3	98.56	1.44
CIP 460745	1	193	17	91.90	8.10
	2	187	19	90.78	9.22
	3	203	14	93.55	6.45
	4	197	11	94.71	5.29
CIP 460763	1	199	5	97.55	2.45
	2	2310	0	100.00	0.00
	3	206	21	90.75	9.25
	4	253	10	96.20	3.80

Anexo 9.9. Diámetros de polen en los individuos en cada entrada evaluada.

Entrada	Individuo	Diámetro (0.01mm)													
CIP 420023	1	10.75	10.75	11.18	11.18	10.75	11.18	10.75	10.75	9.89	10.75	11.18	10.75	10.75	
CIP 421123	1	11.18	10.75	10.75	10.75	10.32	10.75	11.18	10.75	11.18	11.18	10.75	11.18	11.18	
CIP 430452	1	11.61	10.32	9.89	9.89	10.32	11.18	10.75	10.32	10.75	10.75	10.32	10.32	10.75	
CIP 430434	1	10.32	9.89	10.32	9.89	10.32	10.75	10.32	10.32	10.75	10.32	10.32	10.32	9.03	
	2	9.46	9.46	9.89	9.89	9.46	9.46	9.46	10.32	9.89	9.89	9.89	9.89	10.32	
	3	10.75	10.32	9.46	9.46	9.89	9.89	9.89	9.89	9.89	10.75	10.32	9.89	10.75	
	4	9.89	10.32	9.46	9.03	10.32	9.89	9.46	9.46	10.32	9.89	9.46	9.89	9.89	
	5	9.46	9.89	9.89	9.89	9.89	9.89	10.32	10.32	9.46	9.89	9.46	9.46	9.89	
CIP 430406	1	9.03	8.60	9.46	9.46	9.46	8.60	8.60	9.03	9.03	8.60	8.60	9.46	8.60	
	2	9.46	8.60	9.03	9.46	8.60	9.03	9.03	9.03	9.03	9.03	8.60	9.46	8.60	
	3	9.03	8.60	9.03	9.03	8.60	9.03	8.60	9.03	8.60	8.60	8.60	8.60	9.03	
	4	9.03	9.03	8.60	9.03	9.03	8.60	8.60	8.60	8.60	9.46	9.46	8.60	8.60	
CIP 460097	1	8.60	9.03	8.60	9.03	9.46	9.03	8.60	9.03	9.03	9.03	9.03	9.03	9.03	
	2	8.60	8.17	8.60	8.60	8.17	8.60	8.60	8.17	8.17	8.17	8.17	8.60	8.17	
	3	9.03	7.31	8.17	8.60	9.03	9.03	9.03	9.03	9.03	9.03	8.17	8.60	9.03	
	4	9.03	8.17	8.17	8.60	8.60	8.17	8.60	8.60	8.17	8.17	8.60	8.60	8.17	
CIP 460099	1	9.03	8.60	8.17	8.60	8.17	8.17	8.60	8.17	8.60	8.17	8.60	8.17	8.17	
	2	8.17	8.60	8.17	8.60	8.60	9.03	8.60	8.60	9.03	9.03	8.60	8.17	8.60	
	3	9.03	8.60	8.60	8.60	8.60	8.60	9.03	8.60	9.03	8.17	8.60	8.17	8.60	
	4	8.17	8.60	8.17	8.60	8.60	8.17	8.60	8.17	8.17	8.60	8.17	8.17	8.60	
	5	8.60	8.17	8.60	9.03	8.60	9.03	9.03	9.46	9.03	8.60	8.60	8.60	8.60	

Anexo 9.9. Continuación

Entrada	Individuo	Diámetro (0.01mm)												
CIP 460109	1	8.17	8.60	8.60	8.17	8.60	8.60	8.60	8.60	8.60	8.60	8.60	8.60	8.60
	2	8.60	8.60	9.03	9.03	8.60	9.03	8.60	9.03	9.03	8.60	8.60	8.60	9.03
	3	8.60	8.17	8.60	8.17	9.03	8.17	8.60	8.17	8.17	8.17	8.17	8.17	8.17
	4	9.03	8.17	9.03	8.17	9.03	8.60	8.60	8.17	8.60	8.60	8.17	8.60	8.60
	5	9.46	8.60	9.03	8.60	8.60	8.60	8.17	9.03	8.17	8.60	8.60	8.17	8.60
CIP 460110	1	9.03	9.46	9.03	9.03	9.46	9.03	9.03	9.03	9.03	9.03	8.60	8.60	8.60
	2	9.03	8.60	8.60	8.60	8.60	9.03	9.03	9.03	8.60	8.60	8.60	8.60	8.60
	3	9.46	9.46	9.03	9.46	9.03	9.03	9.03	9.03	9.03	9.03	9.03	9.03	9.03
	4	9.03	9.03	9.46	8.60	9.03	9.03	9.03	8.60	8.60	9.03	9.03	9.46	8.60
CIP 460187	1	8.60	8.60	8.17	8.17	9.03	9.03	8.17	8.60	8.60	9.03	8.60	8.17	8.60
	2	8.17	7.74	8.17	8.17	8.17	8.17	8.17	8.60	8.17	8.17	7.74	7.74	8.17
	3	8.60	8.60	8.60	8.60	8.60	8.17	8.17	8.60	8.17	8.17	8.17	8.17	8.60
CIP 460232	1	8.60	9.03	9.03	9.46	8.60	8.60	8.60	8.60	9.03	8.60	9.03	8.60	8.60
	2	8.17	8.17	8.17	8.17	8.17	7.74	8.17	8.17	7.74	7.74	8.17	7.74	8.17
	3	8.60	9.89	8.17	8.60	8.17	9.46	9.03	9.46	8.60	9.46	8.60	9.46	9.89
CIP 460262	1	9.89	9.89	10.32	9.46	9.89	9.46	9.89	10.32	9.89	9.46	9.46	9.89	10.32
	2	9.46	9.46	9.03	9.03	9.03	9.03	9.03	9.03	9.03	9.46	9.46	9.46	9.89
	3	9.46	9.46	9.46	9.03	8.60	9.46	9.03	8.60	9.46	9.03	9.03	9.03	9.46
	4	8.17	8.17	8.60	8.60	8.60	8.60	8.17	8.60	8.60	8.60	8.60	9.03	8.60
	5	8.60	7.74	8.17	7.74	7.74	8.17	7.74	7.74	7.74	8.60	7.74	7.74	8.17
CIP 460375	1	9.03	9.03	9.03	9.03	9.03	9.46	9.03	9.46	9.46	9.03	9.89	9.03	9.46
	2	9.03	9.03	9.03	8.60	9.03	8.60	9.03	9.03	8.60	9.03	9.46	8.60	9.03
	3	8.60	8.17	8.60	8.17	9.03	8.17	8.60	8.60	8.60	8.60	8.60	8.60	8.60
	4	9.46	9.03	9.03	9.03	9.03	8.60	9.03	8.60	9.03	8.60	9.03	9.46	9.46
	5	9.03	8.60	9.03	8.60	9.03	9.03	8.17	8.60	8.60	9.03	8.60	9.03	8.60

Anexo 9.9. Continuación

Entrada	Individuo	Diámetro (0.01mm)												
CIP 460379	1	9.03	9.46	9.03	9.46	9.03	8.60	9.03	8.60	9.46	9.46	9.03	9.03	9.03
	2	8.60	9.03	9.03	8.60	9.03	9.03	8.60	9.03	9.03	8.60	8.60	8.60	9.03
	3	9.03	9.03	9.03	9.03	9.03	8.60	9.03	9.46	9.03	9.03	8.60	8.60	8.60
	4	9.03	9.46	9.46	9.46	9.03	8.60	9.03	9.03	9.03	9.03	9.03	9.03	9.03
	5	9.03	8.60	9.03	9.03	9.03	9.46	8.60	8.60	8.60	9.03	9.03	9.03	8.60
	6	9.03	9.46	9.03	9.46	9.46	9.03	9.03	9.03	9.03	9.46	9.46	9.03	9.03
CIP 460380	1	9.03	9.03	8.60	8.60	8.60	9.03	8.60	9.03	8.60	9.03	8.60	8.60	9.03
	2	8.60	9.03	8.60	8.60	8.60	8.60	8.60	9.03	8.60	8.60	8.60	8.60	8.17
	3	8.60	8.17	8.60	8.17	8.60	8.60	8.60	8.60	8.17	8.60	8.60	8.60	8.60
	4	8.60	8.17	8.60	8.60	8.60	8.17	8.17	8.60	8.17	9.03	8.60	8.17	8.17
	5	8.60	9.03	8.60	9.03	8.60	8.60	9.03	9.03	9.03	8.60	9.03	9.03	9.03
	6	9.03	8.60	8.60	9.03	9.03	9.03	9.03	8.60	9.03	9.03	8.60	9.03	8.60
	7	8.60	8.60	8.60	8.60	8.60	8.17	8.60	9.03	8.60	8.60	9.03	8.60	8.60
CIP 460385	1	9.46	9.03	9.03	9.03	9.03	9.46	8.60	9.89	9.03	9.03	9.03	8.60	9.03
	2	9.03	9.46	9.46	9.46	9.46	9.46	9.46	9.03	9.46	9.46	9.03	9.03	9.46
	3	7.74	8.17	8.60	8.17	8.60	8.17	8.17	8.60	8.17	8.60	8.17	8.17	8.17
	4	9.03	9.03	9.03	9.03	8.60	9.03	8.60	9.03	8.60	8.60	9.03	8.60	9.03
	5	9.03	9.03	9.03	9.03	9.03	9.03	9.03	8.60	8.60	8.60	9.03	8.60	9.03
	6	9.46	9.46	9.46	9.46	9.46	9.03	8.60	9.03	9.03	9.03	9.03	8.60	9.03
	7	9.03	9.03	9.46	9.03	9.46	9.03	8.60	8.60	8.60	8.17	8.60	8.60	8.60

Anexo 9.9. Continuación

Entrada	Individuo	Diámetro (0.01mm)												
CIP 460386	1	8.60	9.03	9.03	8.60	9.03	8.60	8.60	8.60	8.60	9.03	8.60	9.03	9.03
	2	9.03	9.03	9.03	9.46	9.03	8.60	9.03	9.03	9.46	9.46	9.03	9.03	9.03
	3	9.03	8.60	9.03	9.46	9.46	9.03	8.60	9.03	9.03	9.03	8.60	8.60	8.60
	4	9.03	9.46	9.46	8.60	9.03	8.60	8.60	8.60	8.17	8.17	8.17	8.60	9.03
	5	9.46	9.03	9.03	9.03	9.46	9.03	9.03	9.03	9.46	9.03	9.03	9.46	9.03
	6	8.60	8.60	8.60	8.60	8.60	8.17	8.60	9.03	8.60	9.46	9.46	9.46	9.46
	7	9.46	9.03	9.46	9.03	8.60	8.60	8.60	8.60	8.60	9.03	9.03	9.03	9.46
CIP 460387	1	9.03	9.03	8.60	8.60	8.60	8.60	8.60	8.60	8.60	9.46	9.03	9.03	9.03
	2	9.46	9.46	8.60	9.03	8.60	9.46	9.46	8.60	9.03	9.03	9.03	9.03	9.03
	3	8.60	8.60	8.60	9.03	9.46	9.03	9.03	9.46	9.03	8.60	9.46	9.03	8.60
	4	8.17	8.60	8.60	8.17	8.60	8.60	8.60	8.17	9.03	8.60	8.60	8.60	8.17
	5	9.03	9.03	9.03	9.03	9.46	9.03	8.60	9.03	8.60	8.60	8.60	8.60	9.03
	6	9.46	9.46	9.03	8.60	9.03	9.03	8.60	9.03	9.03	9.03	9.46	9.46	9.46
CIP 460388	1	8.60	8.60	8.60	8.60	8.60	8.60	9.03	9.03	9.03	9.03	8.60	8.60	8.60
	2	9.46	9.46	9.46	9.46	9.03	9.03	9.46	9.46	8.60	9.03	9.46	9.46	9.46
	3	8.60	9.03	8.60	8.60	9.89	8.60	9.03	9.46	9.89	9.89	9.89	9.89	9.89
	4	8.17	8.17	8.60	9.03	9.03	9.03	9.03	9.03	9.03	9.46	9.03	9.03	9.03
	5	9.03	9.46	9.89	9.89	9.46	9.89	9.89	9.46	9.46	9.46	9.03	9.03	9.46
	6	8.60	8.60	8.60	8.60	8.60	8.60	8.60	9.46	9.46	8.60	9.89	9.89	9.89
CIP 460390	1	9.03	9.03	9.46	9.03	9.46	9.03	9.46	9.03	9.46	9.03	9.03	9.46	9.46
	2	9.03	9.03	9.46	9.46	9.46	9.46	9.46	9.46	8.60	8.60	9.03	9.03	9.03
	3	8.60	9.03	9.03	9.46	9.03	9.03	8.60	8.60	9.03	8.60	9.03	9.03	9.03
	4	9.46	9.46	9.46	9.46	9.46	9.46	9.03	8.60	8.60	8.60	9.46	9.03	8.60
	5	8.60	9.03	9.03	9.03	8.60	8.60	9.03	9.03	9.03	9.46	9.03	9.03	9.46

Anexo 9.9. Continuación

Entrada	Individuo	Diámetro (0.01mm)												
CIP 460403	1	8.60	9.03	8.60	9.03	9.03	8.60	8.60	9.03	9.03	9.03	9.03	8.60	8.60
	2	9.03	9.03	9.46	8.60	8.60	9.46	9.46	9.46	9.46	9.03	9.03	9.03	9.89
	3	9.03	9.46	9.46	9.03	9.03	9.03	9.03	8.60	9.03	9.03	8.60	9.03	9.03
	4	9.03	9.03	8.60	9.46	9.46	9.03	8.60	9.46	8.60	9.03	9.46	9.03	9.03
CIP 460406	1	9.46	8.60	8.60	9.03	9.03	9.03	8.60	9.03	9.03	9.03	9.46	9.03	9.03
	2	8.60	8.60	8.60	8.60	8.60	8.60	9.03	9.03	9.03	8.17	9.46	9.03	9.03
	3	8.60	8.60	9.03	8.60	8.60	8.60	8.60	8.60	8.60	8.60	8.60	8.60	8.60
	4	9.03	9.46	9.46	8.60	8.60	8.17	8.60	8.17	8.17	9.03	9.03	9.03	8.60
CIP 460407	1	9.03	9.46	9.03	8.60	9.03	9.03	8.60	8.60	8.60	8.60	8.60	8.60	9.03
	2	8.60	8.60	8.60	8.60	8.60	9.03	9.03	9.03	9.03	9.03	9.03	9.03	9.46
	3	8.60	9.03	9.03	9.03	8.60	8.60	8.60	9.03	8.60	8.60	8.60	8.60	8.60
	4	9.89	9.03	9.46	9.03	9.89	9.89	9.46	9.89	9.46	9.03	9.03	9.46	9.89
CIP 460408	1	9.46	8.60	9.46	9.89	9.89	9.89	9.89	8.60	9.46	9.46	9.03	9.89	9.89
	2	9.03	9.03	9.03	9.03	8.60	9.03	9.03	9.03	9.46	9.03	9.03	9.46	9.46
	3	9.46	9.46	9.03	8.60	9.03	8.60	8.60	9.46	9.46	9.46	9.03	9.46	8.60
	4	9.46	9.03	9.03	8.60	9.03	9.46	9.46	8.60	9.46	9.03	9.03	9.46	9.03
	5	9.03	9.03	8.60	8.60	9.03	8.60	8.17	8.17	8.17	8.60	8.60	8.60	8.60
	6	8.60	9.03	9.03	8.60	8.60	8.17	8.60	8.60	8.60	8.60	8.17	8.60	8.60
	7	9.03	9.03	9.46	8.60	9.03	9.03	9.03	8.60	9.46	9.46	9.46	9.03	9.03
	8	8.17	7.74	8.17	8.17	8.17	8.17	8.17	8.60	8.17	8.17	7.74	7.74	8.17
	9	9.89	9.46	9.03	8.60	9.03	9.03	9.03	9.03	9.03	9.03	8.60	9.03	8.60
	10	9.46	10.32	10.32	10.32	9.89	9.46	9.89	9.03	9.03	9.46	9.46	9.03	9.03
CIP 460410	1	8.60	8.60	8.60	8.17	8.60	8.60	8.60	8.60	8.60	8.60	8.60	8.60	8.60
	2	9.89	9.89	9.03	9.89	9.46	9.46	9.46	9.89	9.03	9.89	9.46	9.46	10.32
	3	9.46	9.89	9.89	9.03	9.03	9.03	9.03	9.46	9.46	9.89	9.46	9.46	9.03

Anexo 9.9. Continuación

Entrada	Individuo	Diámetro (0.01mm)												
CIP 460411	1	9.46	8.60	8.60	8.60	9.03	8.60	8.60	9.03	8.60	8.60	9.03	8.60	8.60
	2	10.32	10.75	10.32	10.75	10.75	10.75	10.75	10.32	10.32	10.75	10.32	10.32	10.75
	3	9.46	10.75	10.75	10.75	10.32	10.32	10.32	11.18	9.89	9.89	10.75	10.75	10.75
	4	9.03	9.46	9.03	8.60	9.46	9.46	9.46	9.46	9.46	9.46	9.03	9.03	9.03
	5	9.46	9.03	9.46	8.17	9.03	9.03	9.03	8.60	9.03	9.03	9.03	9.03	9.03
	6	8.60	8.60	8.60	9.03	8.60	9.03	8.60	9.89	9.46	8.60	9.03	8.60	8.60
	7	9.03	9.03	9.03	8.60	9.46	9.03	9.03	9.03	8.60	8.60	9.03	9.03	9.03
CIP 460424	1	8.60	8.60	9.03	8.60	9.46	9.03	9.03	9.46	9.03	9.03	8.60	9.46	9.46
	2	9.03	8.60	8.60	9.03	8.60	9.03	8.60	8.60	8.60	9.46	9.46	9.03	9.46
	3	8.60	9.03	9.03	9.03	9.03	8.60	8.60	8.60	8.60	8.60	8.60	9.03	8.60
	4	9.03	9.46	9.03	9.03	9.03	9.46	9.46	9.46	8.60	9.03	9.03	9.03	9.03
CIP 460429	1	8.60	7.74	8.60	8.17	8.60	8.60	8.17	8.60	8.60	9.03	8.60	8.60	8.60
	2	8.17	8.60	8.60	8.17	8.17	8.17	8.60	8.60	8.17	8.60	9.03	8.17	8.60
	3	8.17	8.17	8.60	8.17	8.60	8.60	8.17	8.17	8.60	8.17	8.17	8.17	8.60
	4	8.17	8.17	7.74	8.17	7.74	8.60	8.60	8.60	8.60	8.60	8.17	7.74	8.60
	5	9.03	8.17	9.03	8.60	9.03	9.03	8.60	8.60	9.03	8.60	8.60	8.60	8.60
	6	8.60	8.17	8.60	9.03	9.03	9.46	9.03	8.17	8.60	8.60	8.60	9.03	8.17
CIP 460431	1	8.60	9.03	8.60	8.60	8.60	8.60	8.60	8.60	8.60	9.03	8.60	8.60	8.60
	2	9.46	9.46	9.46	9.46	9.46	9.46	9.46	9.46	9.46	9.46	9.03	8.60	9.46
	3	9.03	9.03	9.03	9.46	9.03	9.03	9.03	8.60	9.03	9.03	9.03	8.60	9.03
	4	8.60	9.03	9.03	9.46	9.03	8.60	9.03	8.60	9.46	8.60	8.60	8.60	8.17
	5	9.89	9.89	9.89	9.89	9.89	9.46	9.89	9.46	9.46	9.46	9.46	9.89	9.89
	6	8.60	8.60	8.60	9.03	8.17	9.03	9.03	9.03	9.03	9.03	9.03	9.03	8.60
	7	8.60	8.60	8.17	8.60	9.03	9.03	8.60	9.03	9.03	9.03	9.03	8.60	8.60

Anexo 9.9. Continuación

Entrada	Individuo	Diámetro (0.01mm)												
CIP 460432	1	9.46	9.89	9.46	10.32	10.32	9.46	9.46	10.32	10.32	9.89	9.46	10.32	9.46
	2	8.60	8.60	9.03	8.60	8.60	9.03	9.03	9.03	9.03	8.60	9.03	9.03	8.60
	3	8.60	8.60	8.60	8.60	8.60	8.60	8.60	8.60	8.60	9.03	9.03	9.03	8.17
	4	9.46	9.46	9.46	9.46	9.46	9.46	9.89	9.03	9.03	9.03	9.03	8.60	9.03
	5	8.60	8.17	8.60	9.03	8.60	9.03	8.60	9.03	8.60	9.03	8.60	8.60	8.60
	6	9.46	9.46	9.46	9.03	9.03	9.46	9.03	9.03	9.03	9.03	9.03	9.46	9.46
CIP 460438	1	9.46	9.03	8.60	8.17	8.60	9.46	8.17	8.60	8.60	8.60	9.03	8.60	8.17
	2	8.17	7.74	8.17	8.17	8.60	8.17	7.74	7.74	8.17	8.60	9.03	9.03	8.17
	3	9.03	8.60	8.60	8.60	9.89	9.46	9.89	9.46	9.03	8.60	9.03	9.89	9.46
	4	8.17	8.17	7.74	7.74	8.17	8.17	8.17	7.74	8.17	8.60	8.17	8.60	8.17
CIP 460551	1	9.03	9.46	9.03	9.03	8.60	9.03	9.89	9.46	9.89	10.75	10.32	9.89	10.32
	2	9.89	11.18	11.18	10.75	11.18	11.18	10.32	10.75	10.32	10.32	10.32	10.75	10.75
	3	8.60	8.60	8.60	9.03	8.60	8.60	8.17	8.17	9.03	8.17	8.17	8.60	8.60
	4	9.46	9.03	9.46	9.46	9.03	9.03	7.74	9.03	9.03	9.03	9.46	9.46	9.03
	5	9.89	9.03	9.46	9.46	9.46	9.89	9.03	9.46	9.89	9.89	8.60	8.60	9.46
	6	10.32	10.32	10.75	10.75	10.75	10.32	10.75	10.32	10.75	10.32	10.75	10.32	9.46
CIP 460736	1	8.60	8.60	8.60	8.60	8.60	8.60	8.60	8.60	8.60	8.60	8.60	8.60	8.60
	2	8.60	8.60	9.03	8.60	9.03	8.60	8.60	9.46	9.03	9.03	8.60	8.60	8.60
	3	9.03	8.60	9.03	9.03	9.03	8.60	9.03	8.17	9.03	8.60	8.17	8.60	8.60
	4	8.60	8.60	8.60	8.60	8.17	9.03	9.03	8.60	8.60	9.03	8.60	9.03	8.60
CIP 460745	1	10.32	10.32	10.32	9.89	9.46	9.46	9.46	10.32	9.89	9.46	9.46	9.89	9.89
	2	9.46	9.46	9.46	9.46	8.60	8.60	9.46	9.03	9.03	9.03	9.46	9.03	9.46
	3	9.03	9.03	8.60	8.60	8.60	9.03	8.60	8.60	8.60	9.03	9.03	8.60	8.60
	4	9.89	9.89	9.89	9.89	9.89	9.89	10.32	9.89	10.32	10.32	9.89	10.32	9.89

Anexo 9.9. Continuación

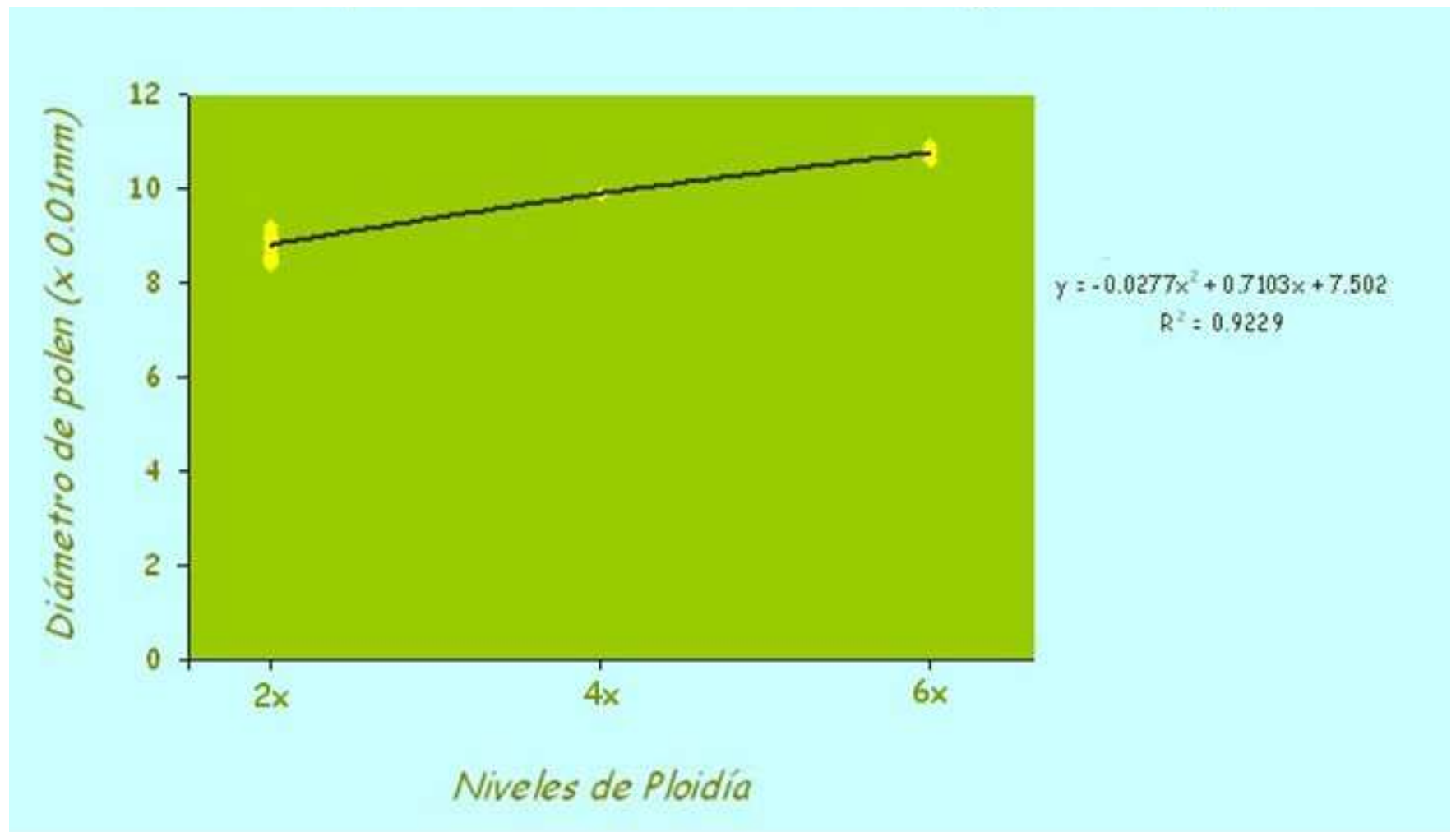
Entrada	Individuo	Diámetro (0.01mm)												
CIP 460763	1	9.03	8.60	8.60	9.03	8.60	8.60	9.03	8.60	9.03	9.03	8.60	8.60	9.03
	2	8.60	9.03	8.60	9.03	9.03	9.03	9.03	9.46	9.03	9.03	9.03	9.03	9.03
	3	8.17	8.17	8.17	8.17	8.60	8.60	8.60	9.03	9.03	8.17	8.17	9.03	8.60
	4	9.46	8.60	9.03	8.60	8.60	9.03	9.03	9.46	9.03	9.03	8.60	8.60	8.60

Anexo 9.10. Análisis de varianza, con el programa SAS, para comparar las diferencias entre los diámetros de polen de todas las entradas, incluyendo los controles. La probabilidad $p < .0001$ indica que existen diferencias significativas entre los valores de diámetro de todas las entradas.

	DF	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	Pr > F
Entrada	32	1.950.939.583	60.966862	80.74	<.0001
Individuo(entrada)	135	1.794.643.254	13.293.654	17.61	<.0001
Error	1848	1.395.416.667	0.755096		
Total	2015	5.140.999.504			

Anexo 9.11. Análisis de varianza para comparar las diferencias entre los diámetros de polen de las entradas, que presentan valores de diámetro homogéneo entre sus individuos, con los controles. La probabilidad $p < .0001$ nos indica que existen diferencias significativas entre los valores de diámetro de polen de los tres niveles de ploidía.

	DF	Tipo III SS	Cuadrados Medios	F	Pr > F
Entrada	20	264.24121	13.212061	27.2	<.0001
Individuo(entrada)	66	32.064064	0.485819		
Error	1044	93.843862	0.089889		
Total	1130	390.149136			



Anexo 9.12. Correlación del nivel de ploidía con los diámetros de grano de polen. Se muestra la ecuación de la gráfica y el coeficiente de determinación. Con el cuál se infiere que el Coeficiente de correlación de Pearson es : $r = 0.9229$

Anexo 9.13. Valores de diámetro de polen superiores al valor de polen promedio en las entradas productoras de polen gigante. Se muestran sólo los individuos que presentaron dichos valores en cada entrada. Los diámetros de considerados como polen gigante se encuentran marcados en negrita. El valor de polen gigante es 30% mayor que el valor de diámetro de polen normal (n)

Entrada	Individuo	Media del diámetro de polen	Valor teórico de polen gigante	Valores mayores que el promedio de polen
CIP 460375	1	9.23	12.00	11.18 11.18 11.18 11.18 12.47
	2	8.93	11.61	11.99
	3	8.53	11.09	9.89 9.46
CIP 460379	2	8.83	11.48	11.61
CIP 460380	3	8.50	11.05	11.61
	5	8.86	11.52	11.61 11.61
CIP 460408	2	9.10	11.83	9.89 9.89 9.89
	3	9.10	11.83	10.32
	4	9.13	11.87	9.89
	5	8.60	11.18	9.46 9.46 9.46
	9	9.03	11.74	12.04 11.18
	10	9.59	12.47	10.75 10.75 10.75 10.75 10.75 11.18
CIP 460411	1	8.77	11.40	10.75
	2	10.55	13.72	11.18 11.18
	3	10.45	13.59	13.76 13.76 11.61 11.61 12.9 12.9 12.9 12.9 13.76 12.9 12.9 14.19
	4	9.23	12.00	10.32 10.32 10.32 10.75 10.32 10.75 10.75
	6	8.86	11.52	9.89 9.89 10.32 11.61 9.89 9.89
	7	8.96	11.65	10.75 10.32 11.18
CIP 460431	5	9.72	12.64	10.32 10.32
	7	8.77	11.40	12.47
CIP 460432	1	9.86	12.81	10.75
	4	9.26	12.04	9.89
	5	8.70	11.31	12.47 12.47